



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARJANA DÜRRIGL

**PRIPRAVA ČVRSTIH DISPERZIJA ZA  
KONTROLIRANO OSLOBAĐANJE LIJEKA  
METODOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2011.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

MARJANA DÜRRIGL

**PREPARATION OF SOLID DISPERSIONS  
FOR CONTROLLED DRUG RELEASE  
VIA SPRAY DRYING**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2011



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARJANA DÜRRIGL

**PRIPRAVA ČVRSTIH DISPERZIJA ZA  
KONTROLIRANO OSLOBAĐANJE LIJEKA  
METODOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:

prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Zagreb, 2011.

## ZAHVALA

*Završavajući ovo izazovno i vrijedno iskustvo u mom znanstvenom radu i životu, želim se zahvaliti svima čije su mi nesebično davanje i potpora pomogli ostvariti ovaj doktorski rad:*

Zahvaljujem menotrici prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić na svim toplim riječima i stalnom poticanju za ostvarivanje viših ciljeva te prenesenom stručnom znanju i iskustvu tijekom studija i nastanka ovog doktorskog rada.

Iskreno zahvaljujem doc. dr. sc. Aniti Hafner i doc. dr. sc. Maji Šegvić-Klarić na uspješnoj stručnoj suradnji te brojnim korisnim diskusijama u pronalaženju rješenja i otklanjanju nedoumica.

Teško je nabrojati sve moje drage prijatelje i kolege iz tvrtke Pliva koji su mi omogućili školovanje, bili potpora u rješavanju znanstvenih i tehničkih problema ili jednostavno oslonac u bremenitim trenucima, pa im svima iskreno i srdačno još jednom zahvaljujem.

Hvala puno Tončeku i Verici na neprestanom bodrednju i pomoći.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji, a posebno mami i tati, bratu i teti Ivanki na stalnoj vjeri u mene, proživljavanju strepnji, pružanju ljubavi i na kraju dijeljenju radosti.

Na kraju, Robert, tebi hvala na strpljenju, razumijevaju i bezuvjetnoj ljubavi.

*U Zagrebu, lipanj 2011.*

*Marjana Dürriegl*



## SAŽETAK

Za potrebe rada pripravljene su i karakterizirane poli(met)akrilne mikročestice s uklopljenim mupirocin kalcijem primjenom tehnike sušenja raspršivanjem. Istraženi su utjecaji omjera lijeka i polimera (5 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5,  $m/m$ ), ulazne temperature (70 – 110 °C), koncentracije otopine za raspršivanje (1-5%,  $m/m$ ), otapala za pripravu otopine za raspršivanje te fizičkih oblika polimera na učinkovitost uklapanja lijeka u mikročestice, iskorištenje procesa, brzinu oslobađanja lijeka iz mikročestica, morfologiju i veličinu čestica te svojstva čvrstog stanja i fizičku stabilnost. Veličina čestica analizirane je metodom difrakcije laserske zrake pri niskom kutu, a morfologija primjenom elektronskog mikroskopa. Svojstva čvrstog stanja određena su primjenom rendgenske difrakcije, modulirane diferencijalne pretražne kalorimetrije i termogravimetrije te Fourier transformirane infracrvene i Ramanove spektroskopije. Kinetika oslobađanja lijeka iz mikročestica analizirana je pomoću monoeksponencijalnih i bieksponencijalnih matematičkih modela. Ispitana je antimikrobna djelotvornost mikročestica na sojevima *Staphylococcus aureus* radi potvrde funkcionalnosti pripremljenih mikročestica kojima se postiže najpovoljnije *in vitro* oslobađanje lijeka.

Najuspješnije kontrolirano oslobađanje ostvareno je za uzorke s povećanim udjelom lijeka (omjer lijeka i polimera 2 : 1,  $m/m$ ), pripremljenim pri povišenim ulaznim temperaturama (100 – 110 °C) ili iz otopina sa sniženom koncentracijom otopine za raspršivanje (<4%,  $m/m$ ). Kontrolirano oslobađanje lijeka ostvareno je i za mikročestice izrađene iz različitih otapala sljedećim redoslijedom: metanol = metanol-etanol (50 : 50,  $m/m$ ) > aceton-izopropanol (40 : 60,  $m/m$ ). Mikročestice izrađene iz različitih otapala bile su fizički stabilne tijekom deset mjeseci, bez znatnijih promjena u načinu oslobađanja lijeka. Antimikrobna djelotvornost lijeka oslobođenoga iz mikročestica pokazao da je lijek sačuvao svoju aktivnost i nakon procesa mikrokapsuliranja. Također, usporeno oslobađanje lijeka potvrđeno je studijama dinamike uginuća na *S. aureus* (ATCC 29213) i na meticilin-rezistentnom soju *S. aureus* (MRSA).

Općenito, početna zasićenost lijeka/polimer u otopini, kao i ulazna temperatura i uporabljena otapala upravljaju procesom očvršćivanja tijekom sušenja kapljice te, posljedično, morfologijom mikročestica i načinom oslobađanja lijeka. Procesom sušenja raspršivanjem iz otopine lijeka i polimera nastaju amorfne čvrste disperzije. Ovisno o omjeru lijeka i polimera, one su čvrste otopine ili kombinacije čvrste otopine i amorfni nakupina lijeka. Kontrolirano oslobađanje lijeka ostvareno je samo iz amorfni čvrstih otopina, uz preduvjet da je polimerni matriks nastao kasnije u procesu sušenja, nakon dovoljnog sažimanja kapljice i stvaranja gušćega polimernog matriksa.

## SUMMARY

Spray dried microparticles containing mupirocin calcium were designed as poly(meth)acrylic matrix carriers with modulated drug release for efficient local drug delivery at minimum daily dose. Particle generation in spray-drying and its effect on release performance were assessed by varying drug:polymer ratios (5:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:5, w/w), inlet temperatures (70-110 °C) and feed concentrations (1%-5%, w/w). Moreover, feed solvent influence at preselected drug:polymer ratios (1:5 and 2:1, w/w) on the performance and stability of the prepared microparticles was assessed. Morphology and particle size were determined using low-angle laser light scattering and a scanning electron microscopy. Profound solid state characterization of the microparticles was conducted using X-ray powder analysis (XRPD), thermogravimetric analyses (TGA), modulated differential scanning calorimetry (MDSC), Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and Fourier transformed Raman spectroscopy (FT Raman). Mathematical modeling (monoexponential and biexponential equations) was applied to characterize drug release kinetics. In addition, a time-kill assay was performed using *S. aureus* (ATCC 29213) and clinically isolated methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains at two concentrations in order to evaluate the antimicrobial activity of microsystems.

The best control over mupirocin release was achieved for 2:1, w/w drug:polymer ratio and found to be strongly process-dependant. The increased feed concentration (>4%) resulted in higher burst release due to looser matrix formation, whereas increased inlet temperature ( $\geq 100^{\circ}\text{C}$ ) reduced burst release since formation of polymer matrices was enhanced by higher molecular mobility and lower solvent residues. Molecular solid dispersions were obtained with weak drug-polymer interaction; phase separation was observed only for the highest drug loading ( $\sim 83\%$ , w/w). Morphology was markedly influenced by drug loading, but with no connection to release behaviour. Mupirocin calcium-loaded microparticles intended for controlled drug release could be obtained even with a high loading ( $\sim 66\%$ , w/w) of readily soluble drug when appropriate spray-drying conditions were achieved and when the polymer deposition kinetics allowed appropriate matrices to be formed.

The superior control of drug release from microparticles was achieved with a 2:1, w/w drug:polymer ratio using solvents in the following order: methanol  $\approx$  methanol:ethanol (50:50, w/w) > isopropanol:acetone (40:60, w/w). The solvent influence on morphology was less pronounced for particular drug loading. However, solvent altered drug-polymer miscibility, conceivably as a result of different solidification kinetics. Moreover, a time-kill assay performed on *S. aureus* (ATCC 29213) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) confirmed a prolonged release

and preservation of antimicrobial activity of encapsulated drug. Irrespective of the solvents used, drug:polymer ratio 1:5, w/w yielded less control over the drug release, as supported by the drug release and antimicrobial activity data. For this drug:polymer ratio, the solvent affected the thermal properties, but without a noteworthy impact on performance. The physical aging of the solid dispersion after ten months of storage had negligible impact on the microparticle performance. The feed solvent influenced the physical characteristics, stability and performance of microparticles. Drug-polymer miscibility and the corresponding thermal properties, morphology, drug release and antimicrobial activity were dependent on the drug loading and the solvent used.

The preparation of microparticles for controlled drug release via spray-drying is a complex task accompanied with challenges to overcome burst release. Drug loading solely is not a sufficient and reliable predictor of drug release pattern and should be evaluated in conjunction with corresponding processing parameters. Microparticles intended for controlled drug delivery necessitate the formation of well-formed (denser) matrices which can be tailored via appropriate spray-drying processing, given that even small variations in the process may profoundly change delivery system performance. Variations of initial saturation of drug/polymer, inlet temperature and solvent used, were recognised as efficient tools to modulate the formation of proper polymer matrices. Conclusively, spray-drying was proven as a suitable method for preparation of structured microparticles able to control drug release even at exceptionally high drug loadings.

## PUBLIKACIJE IZ DOKTORSKOG RADA

### Usmena izlaganja na znanstvenim skupovima

1. *Polimerne mikročestice s kontroliranim oslobađanjem lijeka i sušenje raspršivanjem*, Četvrti hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska, 27. – 30. svibnja 2010.
2. *Microcarriers for controlled local delivery of mupirocin: preparation and characterisation*, 8<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Graz, Austrija, 16. – 18. rujna 2010.

### Objavljeni znanstveni članci

1. Marjana Dürriegl, Ana Kwokal, Anita Hafner, Maja Šegvić Klarić, Aleksandra Dumičić, Biserka Cetina-Čižmek and Jelena Filipović-Grčić, 2011. Spray dried microparticles for controlled delivery of mupirocin calcium: process-tailored modulation of drug release. *Journal of Microencapsulation*. 28(2):108–121.
2. Marjana Dürriegl, Maja Lusina-Kregar, Anita Hafner, Maja Šegvić Klarić and Jelena Filipović-Grčić, 2011. Mupirocin calcium microencapsulation via spray drying: feed solvent influence on microparticle properties, stability and antimicrobial activity. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. In press.

## KLJUČNE RIJEČI

sušenje raspršivanjem, čvrste disperzije, kontrolirano oslobađanje lijeka, stabilnost, antimikrobna djelotvornost, svojstva čvrstog stanja

# SADRŽAJ

ZAHVALA.....	i
SAŽETAK.....	ii
SUMMARY .....	iii
PUBLIKACIJE IZ DOKTORSKOG RADA .....	v
KLJUČNE RIJEČI.....	v
SADRŽAJ.....	vi
1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	5
2.1. Amorfno stanje.....	6
2.1.1. Važnost amornog stanja.....	7
2.1.2. Tehnike amorfizacije.....	8
2.1.3. Fizika amornog stanja .....	9
2.1.3.1. Kauzmannov paradoks.....	12
2.1.4. Teorije staklastog prijelaza .....	12
2.1.4.1. Kinetički model staklastog prijelaza – teorija slobodnog volumena .....	12
2.1.4.2. Termodinamički model staklastog prijelaza.....	13
2.1.5. Stabilnost amorfa.....	13
2.1.5.1. Strukturne relaksacije .....	14
2.1.5.2. Gibljivost molekula (globalna i lokalna).....	15
2.1.5.3. Kemijska stabilnost .....	16
2.2. Čvrste disperzije.....	17
2.2.1. Definicija i tipovi čvrstih disperzija .....	17
2.2.2. Miješanje polimera i lijeka.....	19
2.2.3. Stabilnost čvrstih disperzija .....	22
2.2.3.1. Gibljivost molekula u čvrstim disperzijama.....	22
2.2.3.2. Inherentna sklonost kristalizaciji .....	23
2.2.3.3. Omjer lijeka i polimera.....	23

2.2.3.4.	Molekulska masa polimera .....	24
2.2.3.5.	Interakcije lijeka i polimera .....	24
2.2.3.6.	Utjecaj tehnike izrade .....	25
2.2.4.	Primjena čvrstih disperzija .....	25
2.2.5.	Izrada čvrstih disperzija .....	26
2.2.6.	Karakterizacija čvrstih disperzija .....	27
2.2.6.1.	Rendgenska difrakcija .....	27
2.2.6.2.	Diferencijalna (modulirana) pretražna kalorimetrija .....	27
2.2.6.3.	Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija .....	28
2.2.6.4.	Ramanova spektroskopija/Ramanova mikroskopija .....	29
2.2.6.5.	Adsorpcija vodene pare .....	29
2.2.6.6.	Ostale tehnike .....	30
2.3.	Sušenje raspršivanjem .....	31
2.3.1.	Morfologija i veličina mikročestica .....	31
2.3.2.	Nastanak čestice u procesu sušenja raspršivanjem i temperatura .....	32
2.3.3.	Kompetitivni procesi tijekom sušenja raspršivanjem .....	34
2.3.3.1.	Nastanak čestice i difuzijski procesi .....	35
2.3.3.2.	Nastanak čestica i površinska aktivnost .....	37
2.3.3.3.	Nastanak čestice i topljivost .....	38
2.3.4.	Levitacijsko sušenje kapljica (engl. levitation single-droplet drying) .....	38
2.3.5.	Karakterizacija mikročestica .....	39
2.3.5.1.	Određivanje veličine čestica metodom difrakcije laserske zrake pri niskom kutu .....	39
2.3.5.2.	Pretražna elektronska mikroskopija .....	39
2.3.5.3.	BET analiza .....	40
2.3.5.4.	Mjerenje poroznosti .....	40
2.3.5.5.	Određivanje elementarnog sastava površine mikročestica .....	40
2.3.5.6.	Inverzna plinska kromatografija .....	41
2.3.6.	Primjena sušenja raspršivanjem u farmaceutici .....	41
2.3.7.	Sušenje raspršivanjem i polimetakrilni polimeri .....	43
2.4.	Mupirocin kalcij .....	47
3.	CILJ RADA .....	49
3.1.	Specifični ciljevi rada .....	52

4.	MATERIJALI I METODE .....	53
4.1.	Materijali .....	54
4.1.1.	Polimetakrilni polimeri.....	54
4.1.2.	Ostali materijali .....	55
4.2.	Metode.....	56
4.2.1.	Izrada mikročestica .....	56
4.2.2.	Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u mikročestice .....	59
4.2.3.	In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica .....	59
4.2.4.	Određivanje veličina čestica .....	60
4.2.5.	Karakterizacija čvrstog stanja .....	60
4.2.5.1.	Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija (MDSC) .....	60
4.2.5.2.	Termogravimetrijska analiza (TGA) .....	61
4.2.5.3.	Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR) .....	61
4.2.5.4.	Fourier-transformirana Ramanova spektroskopija (FT Raman).....	61
4.2.5.5.	Rendgenska difrakcija .....	61
4.2.6.	Morfološka karakterizacija mikročestica .....	62
4.2.6.1.	Pretražna elektronska mikroskopija .....	62
4.2.7.	Antimikrobna djelotvornost mikročestica .....	62
4.2.7.1.	Dinamika uginuća bakterija djelovanjem lijeka u vremenu (engl. <i>time-kill study</i> ).....	63
4.2.8.	Statistička analiza .....	63
5.	REZULTATI I RASPRAVA.....	64
5.1.	Utjecaj omjera lijeka i polimera na svojstva mikročestica .....	65
5.1.1.	Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka .....	66
5.1.2.	Morfologija mikročestica .....	67
5.1.3.	Veličina čestica .....	69
5.1.4.	Rendgenska difrakcija mikročestica.....	69
5.1.5.	Termička svojstva mikročestica .....	71
5.1.6.	FTIR i FT Ramanova spektroskopija mikročestica .....	74
5.1.7.	In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica .....	77
5.2.	Utjecaj ulazne temperature na svojstva mikročestica .....	81

5.2.1.	Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka .....	82
5.2.2.	Morfologija mikročestica .....	83
5.2.3.	Veličina čestica .....	84
5.2.4.	Rendgenska difrakcija mikročestica .....	85
5.2.5.	Termička svojstva mikročestica .....	86
5.2.6.	FTIR spektroskopija mikročestica .....	87
5.2.7.	In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica .....	88
5.3.	Utjecaj koncentracije otopine za raspršivanje na svojstva mikročestica .....	93
5.3.1.	Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka .....	94
5.3.2.	Morfologija mikročestica .....	95
5.3.3.	Veličina čestica .....	96
5.3.4.	Rendgenska difrakcija mikročestica .....	97
5.3.5.	Termička svojstva mikročestica .....	98
5.3.6.	FTIR spektroskopija mikročestica .....	99
5.3.7.	In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica .....	100
5.4.	Utjecaj otapala na svojstva mikročestica i njihovu fizičku stabilnost .....	105
5.4.1.	Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka .....	106
5.4.2.	Morfologija mikročestica .....	107
5.4.3.	Veličina čestica .....	109
5.4.4.	Rendgenska difrakcija mikročestica .....	110
5.4.5.	Termička svojstva mikročestica .....	112
5.4.6.	FTIR analize mikročestica .....	113
5.4.7.	In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica .....	115
5.5.	Fizička stabilnost mikročestica izrađenih iz različitih otapala .....	119
5.5.1.	Rendgenska difrakcija mikročestica .....	120
5.5.2.	Termička svojstva mikročestica .....	122
5.5.3.	In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica .....	124
5.6.	Utjecaj fizičkog oblika polimera na svojstva mikročestica .....	127
5.6.1.	Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka .....	128
5.6.2.	Morfologija mikročestica .....	129



5.6.3.	Veličina čestica .....	130
5.6.4.	Rendgenska difrakcija mikročestica .....	131
5.6.5.	In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica .....	131
5.7.	Antimikrobna djelotvornost mikročestica .....	135
5.7.1.	Djelotvornost lijeka nakon oslobađanja iz mikročestica .....	136
5.7.2.	Dinamika uginuća bakterija djelovanjem lijeka u vremenu .....	137
6.	ZAKLJUČCI .....	141
	LITERATURA .....	145
	ŽIVOTOPIS .....	154
	PRILOZI .....	155
	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	189
	BASIC DOCUMENTATION CARD .....	190

## **1. UVOD**

Primjena mikrotehnologije i nanotehnologije u istraživanju novih terapijskih sustava ima neprocjenjiv potencijal. Dostava lijeka na ciljano mjesto djelovanja u željenoj terapijskoj koncentraciji i dalje je izazov istraživačima s područja farmaceutske tehnologije. Standardnim dozirnim oblicima kao što su tablete i injekcije često se ne mogu jednostavno kontrolirati mjesto i brzina oslobađanja lijeka. Koncentracija tako doziranog lijeka nerijetko prelazi toksičnu razinu, a potom slijede brzi metabolizam i uklanjanje iz organizma. Djelotvornost lijeka u tom slučaju ovisi o učestalosti primjene te o brzini biotransformacije i izlučivanja. Suradnja pacijenata u terapiji nije dostatna za osiguranje potpunog učinka lijeka te su se već 1960-ih godina počeli razvijati i primjenjivati napredni terapijski sustavi na bazi silikona i polietilena s kontroliranim oslobađanjem lijeka. Posljednjih godina, kao rezultat intenzivnih biotehnoških istraživanja, otkrivaju se sofisticirani i potentni lijekovi kao što su proteini i nukleinske kiseline. Konvencionalne tehnologije dostave lijeka ne mogu se primijeniti na te molekule zbog vrlo uskoga terapijskog područja i toksičnosti koja se uočava i pri najmanjoj fluktuaciji razine lijeka (Freiberg i Zhu, 2004; Tao i Desai, 2003).

Mikroterapijski sustavi s kontroliranom, modificiranom ili ciljanom dostavom lijeka danas su mnogobrojni, njihova su istraživanja raznovrsna te je gotovo nemoguće obuhvatiti sve trenutačne spoznaje na tom području. Ukratko, mikroterapijski sustavi unaprjeđuju farmakokinetički profil lijeka, a primarno se primjenjuju na onim mjestima gdje je njihova veličina znatna prednost (parenteralno, pulmonarno, okularno, (trans)dermalno, nazalno, intrakranijalno u obliku implantata, pa i oralno, npr. u obliku gastroretentivnih i mukoadhezivnih mikročestica). Nadalje, ovisno o tipu polimera od kojih su izrađene, mikročestice mogu biti mukoadhezivne (npr. kitozanske ili druge polisaharidne) (Agnihotri i sur., 2004; Chowdary i Rao, 2004; Filipović-Grčić i sur., 2003; Liu i sur., 2008; Martinac i sur., 2005a; Martinac i sur., 2005b), lipidne (Hafner i sur., 2009; Muller i sur., 2002), fiziološki razgradljive (npr. polilaktati, poliglikolati ili njihovi kopolimeri) (Jilek i sur., 2005; Mundargi i sur., 2008) ili nerazgradljive (npr. silikonske, metakrilne, etilcelulozne, poloksamerne) (Batrakova i Kabanov, 2008; Pepić i sur., 2010; Tao i Desai, 2003). Danas se u mikroterapijske sustave ugrađuju različite ljekovite tvari, od malih organskih ili neorganskih molekula, pa sve do peptida, proteina, DNK i RNK molekula, cjepiva i gena te

njihovih konjugata za ciljanu dostavu lijeka (Allemann i sur., 1998; Azarmi i sur., 2008; Hughes, 2005; Jiang i sur., 2005; Jilek i sur., 2005; Langer i sur., 1997; Mundargi i sur., 2008; O'Hagan, 1998; Park i sur., 2006).

Mikročestice se proizvode različitim tehnikama utemeljenima na kemijskim i fizičko-kemijskim metodama (hlađenje rastaljenih disperzija, polimerizacija na granici faza, separacija faza iz vodenih i nevodnih medija – koacervacija) te na uklanjanju otapala (ekstrakcija otapala iz emulzija, sušenje raspršivanjem) (Jalšenjak i sur., 1998; Mora-Huertas i sur., 2010; Wischke i Schwendeman, 2008). Razvoj naprednih terapijskih sustava neminovno je uvjetovao snažan napredak tehnologija pripreme mikročestica. Neke od modernijih tehnologija uključuju sušenje raspršivanjem u kriogenim medijima (engl. *spray-freeze drying*), tehnologije utemeljene na uporabi superkritičnih fluida, elektroraspršivanje (engl. *electrospray*), ultrazvučno raspršivanje i mikrofluidizacija (Chow i sur., 2007; Li i sur., 2008; Shoyele i Cawthorne, 2006; Ye i sur., 2010) te neke zaštićene inovativne tehnologije (Microsponge®, Prolease®) (Embil i Nacht, 1996; Tamber i sur., 2005).

Sušenje raspršivanjem istodobno je kompleksan i jednostavan proces pripreme mikročestica s kontroliranim oslobađanjem lijeka (Ré, 2006). Raspršivati se mogu otopine, emulzije ili suspenzije. Ta je tehnika primjenjiva za uklapanje hidrofilnih i hidrofobnih lijekova, za sterilne i termolabilne materijale. U svjetlu nedavnih znanstvenih istraživanja o čestičnom inženjerstvu u sušenju raspršivanjem (Hadinoto i sur., 2007a; Kawakami i sur., 2010; Vehring, 2008), postaje jasno koliko je bitno razumijevanje utjecaja procesnih parametara i sastava formulacije na fizičko-kemijska svojstva mikročestica koje onda određuju njihovu funkcionalnost.

Osim toga, pri brzom sušenju smjese lijeka i polimera najčešće nastaju neuređene, amorfne strukture, tj. čvrste disperzije. One mogu imati svojstva bitno različita od samog lijeka ili polimera. Interakcije između polimera i lijeka, s jedne strane, te struktura čvrstog stanja, s druge strane, mogu mijenjati topljivost i stabilnost lijeka te način njegova oslobađanja iz polimernog matriksa. Amorfni su sustavi podložni strukturnim promjenama koje u konačnici mogu mijenjati način otpuštanja ili dovesti do nepotpunog oslobađanja lijeka. Strukturne relaksacije u amorfnim sustavima ovise o procesu izrade, zaostalim otapalima, kao i o postojanju interakcija (Craig i sur., 1999; Hancock i Zografi, 1997).

Fenomeni koji upravljaju nastankom mikročestica nedovoljno su istraženi. Utjecaj procesnih i formulacijskih parametara na morfologiju, raspodjelu lijeka unutar mikročestice, kontrolu oslobađanja lijeka i ostala fizičko-kemijska svojstva čvrstih disperzija obiluju otvorenim pitanjima. Istraživanja uklapanja mupirocin kalcija u poli(meta)krilni polimer provedena su radi produbljivanja trenutačnih spoznaja o nastanku čestica tijekom sušenja raspršivanjem te o svojstvima i stabilnosti nastalih čvrstih disperzija.

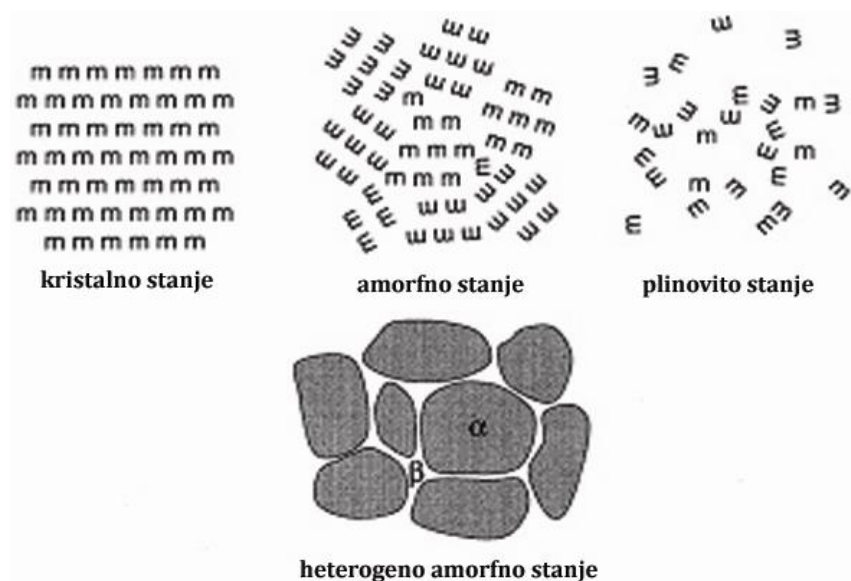
Mupirocin kalcij topički je antibiotik, derivat pseudomonske kiseline i izolat fermentacije *Pseudomonas fluorescens*, koji se u farmakoterapiji primjenjuje isključivo eksterno. Njegove učestale dnevne primjene umanjuju suradnju pacijenata, kao i izgled za uspješnost terapije. Stoga je postojala opravdana potreba da se izradi topički pripravak s kontroliranim oslobađanjem lijeka na površini kože koji bio omogućio jednokratnu dnevnu primjenu lijeka.

## **2. TEORIJSKI DIO**

Teorijski dio obuhvaća tri osnovne cjeline koje prožimaju cilj, rezultate i raspravu te zaključke ove disertacije. Poglavlje počinje osnovnim, suvremenim spoznajama o amorfnom stanju i čvrstim disperzijama, njihovoj fizici, svojstvima i tehnikama karakterizacije. Mnoge teorije koje opisuju amorfnu stanje primjenjive su i za čvrste disperzije kao višekomponentne sustave. Teorijski se dio nastavlja primjenom tih znanja u tehnologiji sušenja raspršivanjem, u potpoglavlju u kojemu se opisuje proces nastanka čestica i svojstva mikročestica koja određuju njihovu funkcionalnost i primjenu. Poglavlje završava podacima o mupirocin kalciju.

## **2.1. Amorfnu stanje**

Mnoge farmaceutski važne tvari, kao što su pomoćne supstancije, funkcionalni polimeri i sami lijekovi (osobito peptidi i proteini), postoje u amorfnom stanju (grč. *amorphos* – bez oblika). Za razliku od kristala, u amorfnom stanju ne postoji periodično uređena trodimenzionalna struktura dugog dosega (sl. 2 - 1). Molekule amorfnu tvari nalaze se u međusobno nasumičnom položaju, slično kao u tekućinama. Međutim, amorfi posjeduju uređenost kratkog dosega na udaljenosti od samo nekoliko molekula. Karakteriziraju ih rezidualna kristaličnost i područja različitih gustoća (Hilden i Morris, 2004; Yu, 2001).



**Slika 2 – 1.** U amorfnom stanju raspored molekula nije u potpunosti nasumičan kao u plinovitom stanju, niti u potpunosti uređen kao u kristalnom stanju. Amorfno stanje može imati područja različite uređenosti (npr.  $\alpha$  i  $\beta$ ), s potpuno drugačijim gustoćama (Yu, 2001).

### ***2.1.1. Važnost amorfnog stanja***

Bitno je naglasiti da su svojstva amorfni tvari znatno drugačija od svojstava njihovih kristalnih inačica (Hancock i Zografi, 1997). U farmaceutskoj industriji amorfni se lijekovi najčešće susreću pri izradi čvrstih disperzija lijeka u polimeru radi postizanja kontroliranog oslobađanja lijeka (uz netopljive polimere), poboljšanja topljivosti lijeka (uz topljive, hidrofilne polimere) te u liofilizatima. Najbitnija prednost amorfa u odnosu prema kristalu jest njegova bolja topljivost, a samim time i bolja bioraspoloživost. No amorfne prati veća kemijska reaktivnost te opasnost od spontanog prijelaza u kristalno stanje (što ugrožava bioraspoloživost lijeka tijekom skladištenja ili obrade) (Hancock i Zografi, 1997). Amorfni lijekovi mogu nastati s namjerom, pa je njihove nedostatke lakše kontrolirati. Međutim, oni vrlo često nastaju tijekom obrade lijeka u tehnološkom procesu, i to u maloj količini na površini kristala, koja se teško detektira, a u konačnici narušava fizičku i kemijsku stabilnost lijeka. Jednako tako, velik broj ekscipijensa ili ljekovitih tvari egzistira u



amorfnom stanju, pa je njegova svojstva potrebno poznavati radi ispravne obrade i čuvanja (Craig i sur., 1999).

### 2.1.2. Tehnike amorfizacije

Tablica 2 – 1. predočuje najčešće tehnike dobivanja amorfnih tvari. Izrada amorfnih materijala relativno je lagana za materijale sklone formiranju staklastih struktura, i obratno. Termodinamički gledano, sklonost tvari da stvara staklasto stanje potječe od svojstava njegova kristalnog stanja, koje može imati „loše“ pakiranje molekula ili više stupnjeva sloboda. Kinetički gledano, spora kristalizacija omogućuje ostakljivanje (engl. *vitrification*) tvari, uz izostanak nukleacije i rasta kristala. Nastanku amorfne pridonosi i postojanje konformacijske fleksibilnosti molekule (kao npr. u ugljikohidrata) (Yu, 2001).

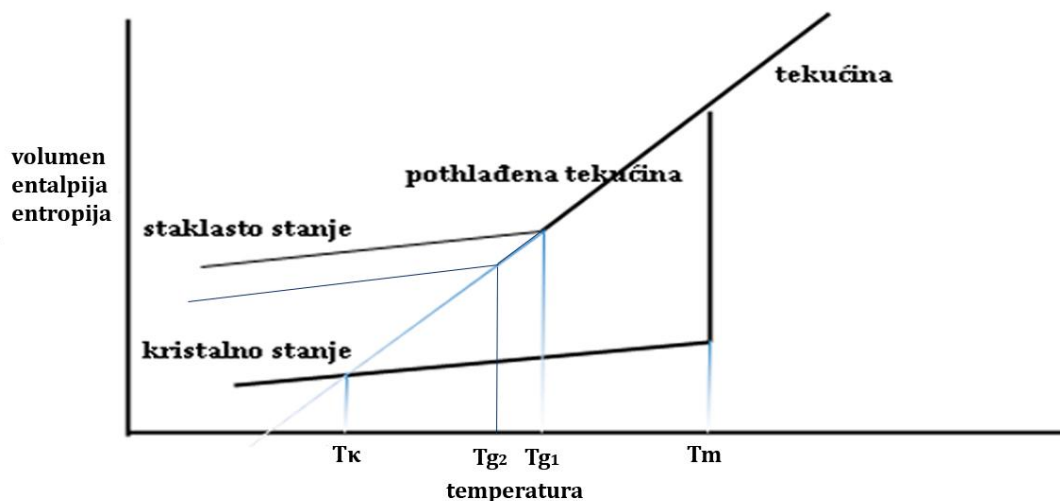
Amorfi, kao što je prije rečeno, imaju stanovitu uređenost. Način izrade najbitniji je parametar koji određuje uređenost kratkog dosega amorfne tvari, a time i njezina svojstva i stabilnost. Na primjer, amorfizacija mljevenjem obuhvaća dovođenje energije za pobuđivanje i lom kristala te nastanak metastabilnoga amorfnog stanja. Nasuprot tome, amorfizacija brzim hlađenjem taline nastaje zbog kontinuiranog porasta viskoznosti. Moguće je pretpostaviti da će amorfno stanje nastalo mljevenjem strukturno nalikovati kristalnom stanju, dok ono nastalo brzim hlađenjem može imati bitno drugačiju lokalnu uređenost (Surana i sur., 2004a).

**Tablica 2 – 1.** Tehnike amorfizacije tvari (Angell, 1995; Surana i sur., 2004b)

<b>Tehnike amorfizacije</b>	kompakcija ili kompresija kristala zračenje ili intenzivno mljevenje kristala difuzijski-kontrolirana reakcija u čvrstom stanju (dehidracija iz hidrata) brzo hlađenje taline (engl. <i>quench-cooling</i> ) isparavanje otapala (sušenje raspršivanjem i liofilizacija) taloženje iz otopine
-----------------------------	--

### 2.1.3. Fizika amorfnog stanja

Ključne razlike između amorfno i kristalno stanja te fazni prijelazi koji ih prate mogu se shematski prikazati dijagramom ovisnosti entalpije ( $H$ ), entropije ( $S$ ) i specifičnog volumena ( $V$ ) o promjeni temperature ( $T$ ) u zatvorenome termodinamičkom sustavu (sl. 2 - 2).



**Slika 2 - 2.** Shematski prikaz promjene volumena, entalpije i entropije s promjenom temperature

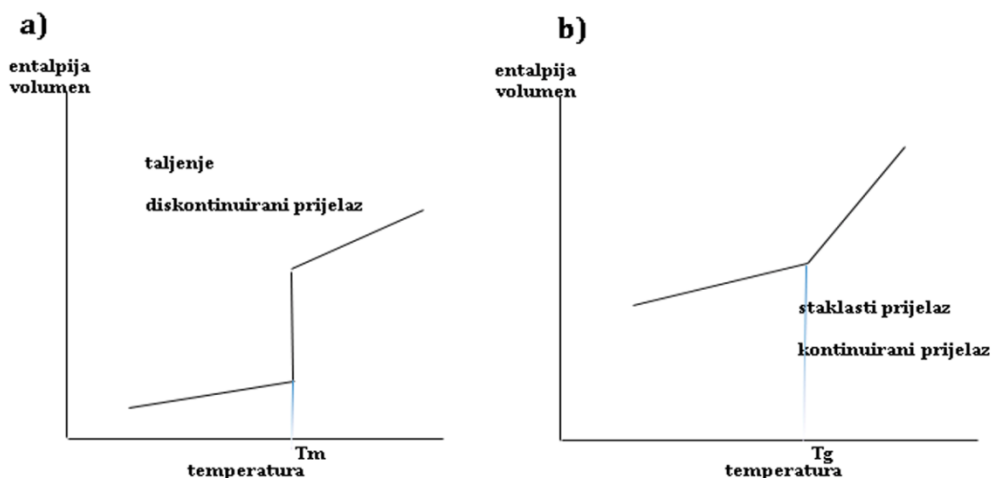
Pri nižim temperaturama, a ovisno o toplinskom kapacitetu ( $C_p$ ) i toplinskome ekspanzijskom koeficijentu ( $\alpha$ ), kristalne tvari pri porastu temperature doživljavaju male promjene entalpije i volumena. Na temperaturi taljenja ( $T_m$ ) kristala događa se fazni prijelaz prvog reda. On je popraćen diskontinuiranom promjenom entalpije ili entropije, što eksperimentalno znači da tijekom fazne transformacije postoji primanje ili otpuštanje toplinske energije (Ågren, 2002).

Nadalje, brzim hlađenjem taline, tj. tekućine, vrijednosti entalpije i volumena prate ravnotežnu liniju ispod temperature taljenja ( $T_m$ ) u područje tzv. pothlađene tekućine (engl. *supercooled liquid*). To se stanje u hrvatskom jeziku češće naziva vis(o)koelastičnim ili gumastim stanjem (engl. *rubbery state*) (Janović, 1997). Proces kristalizacija vidljivo izostaje zbog brzine hlađenja ili zbog nepovoljnih steričkih uvjeta prouzročenih veličinom i oblikom molekula (npr. u većine proteina) (Craig i sur., 1999). Tijekom toga faznog prijelaza nema diskontinuirane promjene entalpije ni volumena. To je stanje strukturno slično

tekućinama, ali ima mnogo veću viskoznost (najčešće između  $10^{-3}$  i  $10^{12}$  Pas) i znatnu molekulsku gibljivost (srednja vremenska skala gibljivosti molekula manja je od 100 s). Karakteristična svojstva pothlađene tekućine izrazito ovise o temperaturi.

Daljnijim hlađenjem tvari dolazi do blage promjene nagiba ravnotežne linije entalpije i volumena te do stvaranja nove staklaste faze (engl. *glassy state*). Fazni se prijelaz događa pri karakterističnoj temperaturi koja označava staklište ili temperaturu staklastog prijelaza ( $T_g$ ) (engl. *glass transition temperature*). Svojstva neravnotežnoga staklastog stanja odstupaju od svojstava gumastog stanja (Hilden i Morris, 2004). Translacijska i rotacijska gibanja molekula u staklastom stanju znatno su smanjena, ali vibracije molekula i dalje postoje (Craig i sur., 1999; Surana i sur., 2004a). Tekućina je praktički „smrznuta“. Staklasto stanje je neravnotežno stanje s višom entalpijom od kristalnog stanja. Daljnje smanjenje temperature ne uzrokuje bitnije promjene staklastog stanja. Viskoznost mu je obično veća od  $10^{12}$  Pas, a srednja vremenska skala gibljivosti molekula veća od 100 s.

Nastanak gumastoga i staklastog stanja smatraju se faznim prijelazima drugog reda (sl. 2 - 3) zbog kontinuirane promjene entalpije i volumena sustava. S obzirom na to da se toplinski kapacitet definira kao nagib pravca ovisnosti entalpije o promjeni temperaturi pri konstantnom tlaku, lako je zaključiti da se na temperaturi staklišta mijenja specifični toplinski kapacitet ( $C_p$ ). Upravo je promjena toplinskog kapaciteta bitno obilježje faznih prijelaza drugog reda. Prijelaz je ovisan o gibljivosti molekula te u njemu nema izmjene toplinske energije (Ågren, 2002; Craig i sur., 1999). Promjena specifičnoga toplinskog kapaciteta pri  $T_g$  varira od tvari do tvari i služi kao mjera fragilnosti amorfno sustava. Staklasto se stanje popularno definira kao tekućina bez sposobnosti tečenja (Angell, 1995). Zbog povišene unutarnje energije amorfno stanje ima promijenjena termodinamička svojstva (npr. topljivost, tlak para, adsorpciju para) i mehanička svojstva te veću kemijsku reaktivnost.



**Slika 2 – 3.** a) Fazni prijelazi prvog reda s diskontinuiranim prijelazom topline i volumena; b) fazni prijelaz drugog reda s kontinuiranim prijelazom entalpije i volumena

Prethodno je opisano nastajanje staklastog stanja naglim hlađenjem taline. Bitno je naglasiti da amorfno stanje nastaje zbog kontinuiranog porasta viskoznosti (kontinuiranog očvršćivanja), dok se kristalizacija događa zbog diskontinuiranog porasta viskoznosti (diskontinuiranog očvršćivanja) tijekom kojega dolazi do rasta kristala u talini. Preduvjet da se umjesto kristalizacije dogodi ostakljivanje jest da kritična brzina hlađenja ( $q_c$ ) bude dovoljno velika, a definira se ovako:

$$q_c = \frac{T_m - T_n}{\tau_{1n}},$$

gdje  $\tau_{1n}$  označava indukcijsko vrijeme nukleacije, a  $T_n$  temperaturu pri kojoj se događa nukleacija. Kada je brzina  $q_c$  dovoljno velika, kristalizacija je spriječena. Najbrže hlađenje koje se eksperimentalno može postići jest  $10^7 \text{ K s}^{-1}$  (npr. pri sušenju raspršivanjem ili uranjanjem taline u tekući dušik) (Hilden i Morris, 2004). Dodatno, temperatura staklišta ovisna je o brzini ostakljivanja te sporije ostakljivanje rezultira nižom temperaturom staklišta ( $T_{g2}$ ; sl. 2 - 2).

### 2.1.3.1. Kauzmannov paradoks

Iz slike 2 – 2. vidljivo je da bi ekstrapolacija ravnotežnog pravca pothlađene tekućine (uz izostanak staklastog prijelaza) pri kritičnoj temperaturi dovela do neuređenog stanja s nižom energijom od kristala te bi sustav u konačnici dosegao negativnu entalpiju. Ta se kritična temperatura naziva Kauzmannovom temperaturom,  $T_K$ , te se smatra najnižom eksperimentalnom temperaturom staklastog prijelaza. Slučaj u kojemu bi metastabilno staklasto stanje poprimilo nižu konfiguracijsku entropiju od kristala naziva se Kauzmannovim paradoksom. Ta se pojava smatra paradoksom jer neuređeno tekuće stanje mora imati veću entropiju nego uređeni kristal. Jedno od rješenje Kauzmannova paradoksa jest nastajanje termodinamički uvjetovanoga staklastog stanja (prije nego entropija pothlađene tekućine padne ispod entropije kristala) pri kojem je zbog promjene toplinskog kapaciteta smanjen gubitak entropije i spriječena termodinamička kriza sustava (Hilden i Morris, 2004).

### 2.1.4. Teorije staklastog prijelaza

Priroda staklastog prijelaza nije jednoznačna. O njoj postoji više teorija, ali nijedna nije univerzalno prihvaćena. Opažanjem da staklasti prijelaz karakteriziraju promjene termodinamičkih parametara kao što su volumen, entalpija i entropija nameće se zaključak da je ta pojava prijelaz drugog reda. Ali s obzirom na to da je primijećena ovisnost staklastog prijelaza o brzini ostakljivanja, a prema definiciji prijelazi drugog reda nisu o tome ovisni, staklasti se prijelaz ne može smatrati idealnim prijelazom drugog reda (Ågren, 2002; Craig i sur., 1999). U daljnjem tekstu opisane su kinetička i termodinamička teorija staklastog prijelaza.

#### 2.1.4.1. Kinetički model staklastog prijelaza – teorija slobodnog volumena

Model slobodnog volumena razvijen je za tekućine uz pretpostavku da su sastavljene od oscilirajućih sfera. Ukupni volumen tekućine podijeljen je na dva dijela: a) na dio koji je zauzet sferama bez termičkih oscilacija pri temperaturi 0 K ( $V_0$ ) i b) na dio koji je slobodan za gibanje i oscilaciju sfera ( $V_s$ ). Slobodni volumen ( $V_s$ ) dalje se može podijeliti na *termički*

*volumen* ( $V_{term}$ ), koji je zauzet tijekom termičkih gibanja sfera i *ostatni volumen* ( $V_{ost}$ ), koji nikad nije zauzet sferama. Slobodni volumen ( $V_s$ ) određen je šupljinama različitih položaja i veličina, ovisno o nasumičnom rasporedu molekula.

S povećanjem temperature raste volumen zauzet termičkim oscilacijama, a smanjuje se gustoća tvari. Vrijedi i obrnuto. Na temperaturama ispod  $T_g$  smanjeni slobodni volumen (i veća gustoća) čine energetske barijere nasumičnoj raspodjeli slobodnog volumena (tj. slobodni je volumen donekle uređen). U tim su uvjetima toplinski ekspanzijski koeficijenti staklastoga i kristalnog stanja slični. U području ispod  $T_g$  povećanje temperature dovodi do povećanja vibracija molekula oko fiksnih položaja uzrokujući ekspanziju. Pritom je volumen još uvijek neravnomjerno raspoređen. Povećanje entropije s povećanjem temperature maleno je jer translacijska gibanja ne pridonose promjeni volumena. Na temperaturama iznad  $T_g$  termička je energija dovoljna za prevladavanje energetskih barijera i ravnomjernu raspodjelu slobodnog volumena. Toplinski ekspanzijski koeficijent postaje sličan koeficijentima tekućina te nastaje povećanje entropije sustava s porastom temperature. Taj pristup često služi za opisivanje polimera (Hilden i Morris, 2004).

#### **2.1.4.2. Termodinamički model staklastog prijelaza**

Termodinamički model staklastog prijelaza bazira se na Gibbs-Dimarziovoj teoriji koja kaže da ispod  $T_g$  postoji pravi termodinamički prijelaz drugog reda kako bi se izbjegla Kauzmannova kriza. Broj atoma koji sudjeluju u kooperativnom razmještanju postaje veći kako se povećava temperatura. S obzirom na to da se s povećanjem slaganja atoma smanjuje entropija, konfiguraciona je entropija varijabla koja kontrolira približavanje staklastom prijelazu. To je u sukobu s kinetičkom teorijom koja, prema kojoj se staklasti prijelaz događa pri konstantnom volumenu (Hilden i Morris, 2004).

#### **2.1.5. Stabilnost amorfa**

Staklasto je stanje neravnotežno u usporedbi s kristalnim, te će se amorf uvijek nastojati vratiti/relaksirati u ravnotežno stanje ili stanje niže energije. Slobodna energija amornog stanja razlika je slobodne energije amornog stanja u usporedbi s kristalnim stanjem. Uvjetovana je tehnikom amorfizacije te se definira kao termička povijest tvari.

Znatno utječe na strukturne relaksacije, difuzivnost, stabilnost i temperature staklišta amorfne tvari.

#### 2.1.5.1. Strukturne relaksacije

Relaksacije su, u njihovoj najširoj definiciji, prijelazi molekula iz nepovoljnijega višeg energetskog stanja u ravnotežno stanje ili stanje niže energije. Strukturne se relaksacije odnose na promjene rasporeda atoma/molekula tijekom relaksacije. Neravnotežna se staklasta stanja zbog znatne gibljivosti molekula, viška slobodne eneregije i većega slobodnog volumena nastoje strukturno vratiti u ravnotežno stanje najniže slobodne energije i najmanjeg volumena. Ta se promjena naziva fizičkim starenjem (engl. *physical ageing, annealing*). Taj proces ovisi o temperaturi (s obzirom na temperaturnu ovisnost gibljivosti molekula) i vremenu (konstanta relaksacijskog vremena  $\tau$  povećava se s vremenom) (Janssens i sur., 2008b; Surana i sur., 2004a). Očito je da su strukturne relaksacije usko povezane s gibljivosti molekula.

Temperaturna ovisnost relaksacijskog vremena opisana je Vogel-Tammann-Fulcherovom jednadžbom:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{DT_0}{T - T_0}\right),$$

u kojoj je  $\tau$  srednje relaksacijsko vrijeme,  $T$  temperatura, a  $\tau_0$ ,  $D$  i  $T_0$  konstante. Pretpostavlja se da  $T_0$  konstanta odgovara Kauzmannovoj temperaturi, a  $\tau_0$  vremenu relaksacije nerestriktivnog materijala. Kad je  $T=0$ , dobiva se poznata Arrheniusova jednadžba te je  $D$  direktno razmjeran aktivacijskoj energiji gibanja molekula.

S obzirom na temperaturnu ovisnost aktivacijske energije potrebne za gibanje molekula neposredno ispod i iznad staklišta, amorge je moguće podijeliti na jake (engl. *strong*) ili fragilne (engl. *fragile*). Neki proteini i silicijev oksid primjeri su tvari koje grade jake amorfne strukture s malom promjenom toplinskog kapaciteta na temperaturi staklišta, tako da se ta promjena obično ne može otkriti rutinskim kalorimetrijskim metodama. Fragilni amorfi imaju izraženiju temperaturnu ovisnost molekulskoga gibanja u blizini  $T_g$  i relativno veliku promjenu toplinskog kapaciteta pri  $T_g$ . U praksi fragilnost amorfa ukazuje

na to kako se brzo povećavaju stukturne relaksacije kad se on zagrijava, približava i prolazi kroz staklasti prijelaz. Kao okvirno pravilo vrijedi sljedeće: relativni omjer temperature taljenja i staklišta ( $T_m/T_g$ ) u kelvinima veći je od 1,5 za jake i manji od 1,5 za fragilne amorfne sustave.

Kohlrausch-William-Wattsova jednadžba povezuje „povratnu“ entalpiju relaksacije,  $\Delta H_{relax}$  (engl. *relaxation recovery enthalpy*) s prosječnom konstantom relaksacijskog vremena,  $\tau$ , i *stretch* parametrom  $\beta$  i glasi:

$$\phi = 1 - \left( \frac{\Delta H_{relax}}{\Delta H_{\infty}} \right) = \exp \left[ \left( \frac{-t}{\tau} \right)^{\beta} \right],$$

pri čemu je  $\Delta H_{\infty}$  energija dostupna za relaksaciju,  $\Delta H_{relax}$  se određuje uporabom DSC-a i detektira se kao endotermni događaj koji se preklapa sa staklastim prijelazom i označava energiju koju staklo mora uzeti iz okoline da bi nakon procesa relaksacije na temperaturi ispod  $T_g$  postao pothlađena tekućina, a  $\phi$  je razina relaksacije koja se kreće između 1, gdje uopće nema relaksacija, i 0, gdje je relaksacija završena.

#### 2.1.5.2. Gibljivost molekula (globalna i lokalna)

Gibljivost molekula koja se primjećuje prilikom prelaska tvari iz staklastoga u gumasto stanje naziva se  $\alpha$ -gibljivost ili globalna gibljivost. Ona označava spora gibanja na većoj udaljenosti, slično onima uključenim u viskozno tečenje tvari. Pravilo  $T_g - 50$  kaže da molekulsko gibanje amorfne tvari postaje zanemarivo 50 °C ispod temperature staklišta i zbog smanjenje gibljivosti smatra se dobrom predikcijom stabilnosti amornog sustava (Yoshioka i sur., 1994).  $\alpha$ -gibljivost se može bitno modificirati dodatkom plastifikatora.

Spoznaja da pojedine amorfne tvari odstupaju od tog pravila te kristaliziraju stajanjem na temperaturama bitno nižima od staklišta, uputile su na zaključak da postoje i drugi činitelji koji utječu na stabilnost amornih tvari te da čuvanje na temperaturama  $T_g - 50$  nije apsolutni uvjet za očuvanje amornosti. Nadalje, pretpostavka da se, ovisno o položaju  $T_g$ , može predvidjeti sklonost amorfa kristalizaciji također se za neke slučajeve pokazala netočnom jer su npr. nifedipin i felodipin sa sličnim  $T_g$  temperaturama imali



različite sklonosti kristalizaciji. Stoga se u novije vrijeme velika pozornost pridaje proučavanju  $\beta$ -gibanja ili lokalnoga gibanja molekula.  $\beta$ -gibanja su brza lokalna kretanja dijelova molekula poput rotacije bočnih lanaca, uz relaksacijska vremena manja od  $10^{-1}$  s (Janssens i Van den Mooter, 2009).  $\beta$ -gibanje molekula poznato je i kao Johari-Goldsteinovo gibanje, prema autorima koji su ga detaljnije opisali. Oni su pokazali da takva gibanja postoje i u malim rigidnim molekulama, bez unutarnjih stupnjeva slobode, koja obuhvaćaju gibanja cijelih molekula. Ta gibanja karakteriziraju niske aktivacijske energije i ona ne prate Arrheniusovu jednadžbu, a njihova se stvarna priroda još uvijek proučava (Bhattacharya i Suryanarayanan, 2009).

$\beta$ -gibanja katkad imaju ozbiljne posljedice na fizičku stabilnost, npr. na rast kristala ili na kemijsku stabilnost. Međutim,  $\beta$ -gibanja makromolekula (proteina) mogu biti zaustavljena uporabom odgovarajućih ekscipijensa, što se primjenjuje pri stabilizaciji makromolekula u liofilizatima.

Neke od dostupnih tehnika za detekciju i proučavanje  $\beta$ -gibanja jesu dielektrična relaksacijska spektroskopija, nuklearna magnetna rezonancija i diferencijalna pretražna kalorimetrija (Bhattacharya i Suryanarayanan, 2009).

#### **2.1.5.3. Kemijska stabilnost**

Kemijska se stabilnost amorfne tvari razlikuje od kemijske stabilnosti kristala. U amorfne tvari reaktivne molekule (ili dijelovi molekule) imaju više „slobode“ i gibljivosti da ostvare degradacijsku reakciju nego kristalne tvari te je za veliki broj lijekova ta teorija i potvrđena.

## 2.2. Čvrste disperzije

### 2.2.1. Definicija i tipovi čvrstih disperzija

Izraz *čvrste disperzije* odnosi se na čvrste smjese fino raspršene tvari (jedne ili više njih) u polimernom nosaču (matriksu). Polimerni nosač može biti kristalan ili amorfan. Unutar nosača tvar može biti raspršena na molekulskoj razini, može postojati u amorfnim nakupinama (klasterima) ili u kristalima (Chiou i Riegelman, 1971). Ovisno o molekulskoj raspodjeli komponenata unutar čvrste disperzije, moguće je razlikovati nekoliko tipova tih disperzija (tabl. 2 – 2, sl. 2 – 4 i 2 – 5).

**Tablica 2 – 2.** Tipovi čvrstih disperzija (van Drooge, 2006)

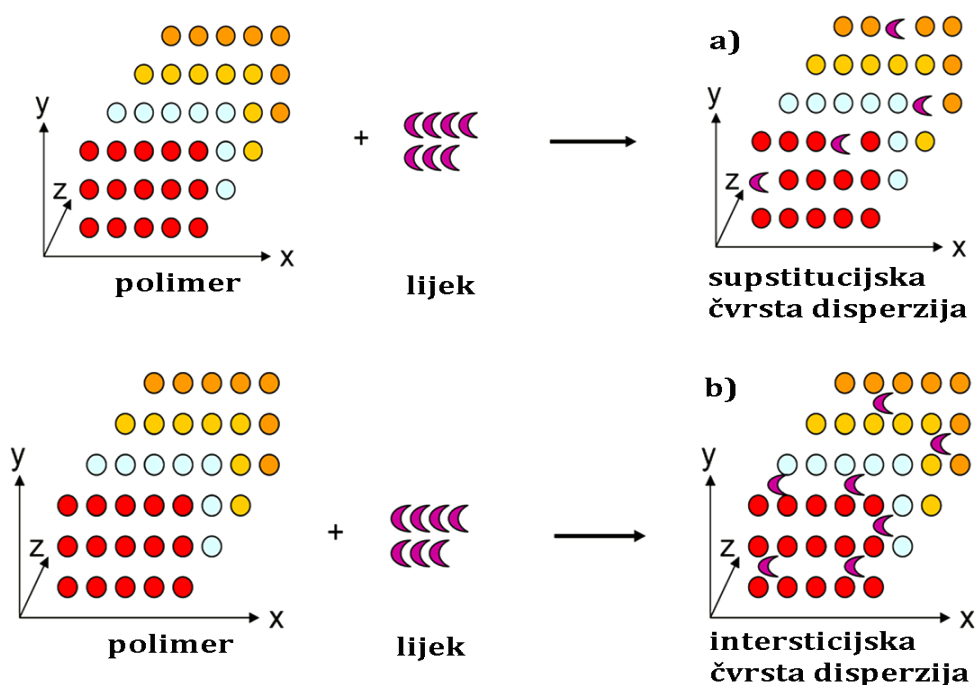
	Tip čvrste disperzije	Nosač	Lijek	Broj faza
1.	eutektička smjesa <sup>a)</sup>	kristalni	kristalni	2
2.	amorfni precipitati lijeka u kristalnom nosaču <sup>b)</sup>	kristalni	amorfni	2
	čvrste otopine			
	kontinuirane čvrste otopine <sup>c)</sup>	kristalni	molekulski raspršen	1
3.	diskontinuirane čvrste otopine	kristalni	molekulski raspršen	2
	supstitucijske čvrste otopine	kristalni	molekulski raspršen	1 ili 2
	intersticijske čvrste otopine	kristalni	molekulski raspršen	2
4.	staklaste suspenzije	amorfni	kristalni	2
5.	staklaste suspenzije	amorfni	amorfni	2
6.	staklaste otopine	amorfni	molekulski raspršen	1

Legenda:

a) prvi izrađeni tip čvrste disperzije nastaje od tvari koje su u čvrstom stanju nemješive, ali su mješive u tekućem stanju, a na temperaturi eutektične smjese u odgovarajućem omjeru tvari zajedno kristaliziraju (Janssens i Van den Mooter, 2009);

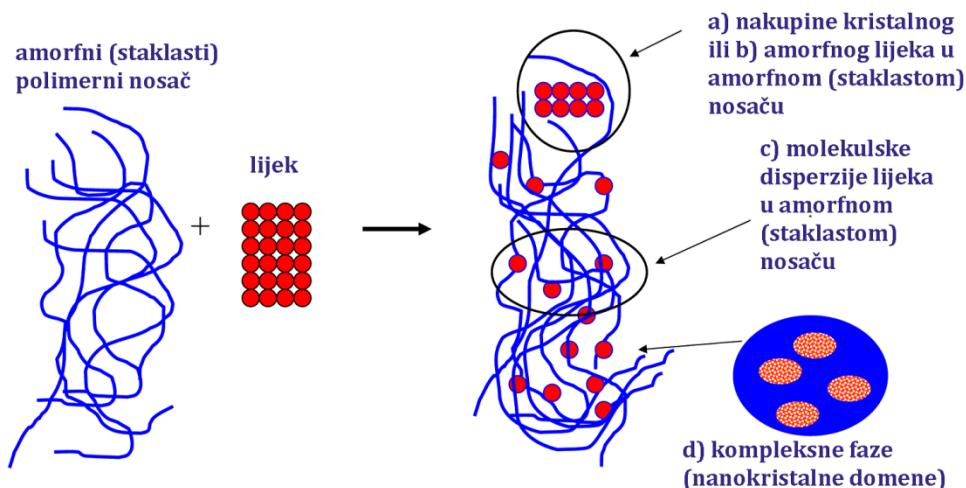
b) iznimno rijedak oblik; c) mješiv pri svim omjerima, nikada izrađen u farmaceutskoj primjeni, koncept preuzet iz fizike metala

Čvrste disperzije nisu uvijek jednostavne te mogu biti kombinacije navedenih tipova. Informacija o tome nalazi li se lijek u nosaču u obliku kristala, amorfni nakupina ili molekulski raspršen govori o tome koja je količina lijeka izložena mediju za otapanje. Način oslobađanja lijeka iz navedenih sustava neće biti jednak. Nadalje, fizička stabilnost čvrstih disperzija ovisi o načinu raspodjele i gibljivosti molekula unutar binarnih smjesa lijeka i polimera. Ako lijek unutar čvrste disperzije egzistira u obliku amorfni nakupina, za njegovu su kristalizaciju potrebna samo rotacijska gibanja molekule. Za molekulski raspršen lijek potrebno je i translacijsko i rotacijsko gibanje molekule prije nego započne kristalizacija. Također, kemijska stabilnost lijeka može ovisiti o fizičkom stanju nosača jer kristalni matriks onemogućuje translacijska i rotacijska gibanja lijeka nužna za potencijalne reakcije razgradnje.



**Slika 2 - 4.** Shematski prikazi a) supstitucijskih čvrstih disperzija (ne postoji velika razlika u veličini molekula lijeka i polimera te se oni mogu međusobno izmjenjivati; disperzije mogu biti kontinuirane i diskontinuirane); b) intersticijskih čvrstih disperzija (postoji velika razlika u veličini molekula; lijek je smješten između polimernih lanaca; disperzije su obično diskontinuirane) (Van den Mooter, 2009)

Općenito, svojstva čvrste disperzije ovisit će o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka i polimera, postojanju interakcija među njima i o tehnici izrade. Danas se u literaturi pod terminom *čvrste disperzije* (bez daljnjeg objašnjenja strukture) najčešće poimaju staklaste (amorfne) otopine/suspencije (tip 4 – 6), ali treba imati na umu da je to mnogo širi pojam koji obuhvaća različite fizičke smjese lijeka i polimera.



**Slika 2 – 5.** Shematski prikazi čvrstih disperzija s amorfnim nosačem: a) staklaste (amorfne) suspencije s kristalnim lijekom; b) staklaste (amorfne) suspencije s nakupinama amorfnog lijeka; c) staklaste (amorfne) otopine molekulski raspršenog lijeka; d) kompleksne strukture (Van den Mooter, 2009)

### 2.2.2. Miješanje polimera i lijeka

Kao što je navedeno u tablici 2 – 3, lijek i polimer u čvrstoj disperziji mogu činiti jednu ili više faza, tj. biti potpuno ili djelomično pomiješani ili pak nemješivi. Za postizanje molekulski raspršenog lijeka unutar staklastog polimera moraju biti zadovoljeni određeni kriteriji topljivosti u čvrstom stanju (engl. *solid solubility*), mješivosti i kinetičke stabilizacije. Topljivost u čvrstom stanju označava termodinamičku topljivost jedne čvrste tvari u drugoj, mješivost podrazumijeva mješivost dviju amorfnih tvari u njihovu pothlađenu tekućem (gumastom) stanju, a kinetička se stabilizacija odnosi na

imobilizaciju prezasićene otopine lijeka u vrlo viskoznome matriksu radi sprječavanja separacije faza i kristalizacije (Janssens i Van den Mooter, 2009).

Za mješive staklaste čvrste disperzije temperatura staklastog prijelaza obično se nalazi između staklišta pojedinih komponenti, a ovisno o njihovim masenim udjelima. Gordon-Taylorova (*skr.* GT) jednažba, utemeljena na teoriji slobodnog volumena, bila je razvijana za proučavanje smjesa polimera (Gordon i Taylor, 1952). Danas se prema njoj računaju staklišta smjesa čvrstih disperzija, a glasi:

$$T_g = \frac{(w_1 T_{g1} + K w_2 T_{g2})}{(w_1 + K w_2)},$$

U jednadžbi su  $T_{g1}$  i  $T_{g2}$  temperature staklišta, a  $w_1$  i  $w_2$  maseni udjeli lijeka i polimera koji čine čvrstu disperziju. Konstanta  $K$  izračunava se prema Simha-Boyerovu pravilu:

$$K = \frac{\rho_1 T_{g1}}{\rho_2 T_{g2}},$$

u kojemu su  $\rho_1$  i  $\rho_2$  gustoće polimera i lijeka. Prema istom načelu mogu se izraditi i jednadžbe za više od dvije komponente (Craig i sur., 1999; Hancock i Zografi, 1997).

Usklađenost temperature staklišta smjese izmjerene i izračunane prema GT jednadžbi služi za otkrivanje neidealnosti miješanja lijeka i polimera, pojave separacije faza, postojanja razlika u veličini molekula (neaditivnosti volumena), prisutnosti plastifikatora i specifičnih interakcija (Hancock i Zografi, 1997). Savršeno izmiješani sustavi imaju samo jedno staklište, a djelomično mješivi više njih. Lako je uočljivo da polimeri s vrlo visokim staklištem mogu dodatno stabilizirati čvrstu disperziju pomicanjem staklišta smjese prema višim temperaturama (koje ga udaljavaju od uobičajenih temperatura skladištenja lijekova) (Six i sur., 2004).

Čvrste disperzije s pozitivnim odstupanjem od GT predikcije opisane su u mnogim radovima (Patterson i sur., 2007; Tajber i sur., 2005; van Drooge i sur., 2006). Primjerice, van Drooge i sur. (2006) pokazali su da  $T_g$  smjese inulina ( $T_g=155$  °C) i diazepama ( $T_g=45$  °C) zbog specifičnih heteromolekulskih interakcija i velike razlike u polarnosti

molekula raste čak iznad  $T_g$  polimera ( $T_{g(\text{smjese})}=158\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Velik porast  $T_g$  smjese ( $>50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) rezultat je nastanka ionskih interakcija između lijeka i polimera, npr. poliakrilne kiseline i bazičnog lijeka (Weuts i sur., 2005).

Amorfne tvari imaju sposobnost apsorpcije velike količine vode. S obzirom na to da je staklišta vode na  $136\text{ K}$  ( $-137,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), njezina prisutnost znatno snižava temperaturu staklišta. Govorimo o plastifikaciji ili omekšavanju amorfne smjese. Plastifikacija označava pojavu smanjenja jakosti međumolekulskih sila, što inducira povećanje slobodnog volumena, gibljivosti i elastičnosti molekula (Janović, 1997). Tvari koje uzrokuju omekšavanje nazivaju se plastifikatorima ili omekšavalima. Zbog sveprisutnosti vode, ona je najčešći plastifikator amornih tvari u farmaceutskim pripravcima. Temperatura, tlak para i svojstva same disperzije utjecat će na razinu adsorpcije vode i plastifikaciju sustava (Janssens i Van den Mooter, 2009). Snižavanje  $T_g$  smjese polimera i lijeka također se susreće u čvrstim disperzijama, a nastaje zbog plastifikacije polimera lijekom (Patterson i sur., 2007). Suprotno plastifikatorima, tvari koje povećavaju staklišta amorfne smjese nazivaju se punilima (često se susreću u kemiji polimera).

Pri postojanju interakcija između polimera i lijeka primjenjuju se  $K_{wei}$  jednadžba, koja predočuju modifikaciju GT jednadžbe i glasi:

$$T_g = \frac{(w_1 T_{g1} + K w_2 T_{g2})}{(w_1 + K w_2)} + q w_1 w_2,$$

gdje je  $q$  parametar prilagodbe ovisan o jakosti vodikovih veza u smjesi polimera i lijeka (Wiranidchamong i sur., 2008).

Ako se smjesa sastoji od amorfne i kristalne faze, mješivost se može proučavati analizom sniženja tališta kristalne faze. Sniženje tališta ovisno o sastavu smjese i postojećim interakcijama izračunava se prema Nishi-Wangovoj jednadžbi utemeljenoj na Flory-Hugginsovoj teoriji:

$$T_m - T_{mb} = \frac{-T_m B V_2 \phi_1^2}{\Delta h_2},$$

gdje su  $T_m$  i  $T_{mb}$  temperature tališta kristalne faze i smjese,  $B$  gustoća interakcijske energije među komponentama,  $V_2$  molarni volumen ponavljajuće jedinice kristalne tvari,  $\Phi_1$  volumni udio amorfne faze, a  $\Delta h_2$  toplina spajanja mola kristalne faze po molu ponavljajuće jedinice polimera (Wiranidchamong i sur., 2008).

### **2.2.3. Stabilnost čvrstih disperzija**

Optimalna stabilnost čvrstih disperzija postiže se smanjenjem gibljivosti molekula. Nasuprot tome stoji činjenica da su čvrste disperzije termodinamički nestabilne. Kad se čvrste disperzije lijeka u polimeru iskorištavaju za kontrolirano oslobađanja lijeka (npr. mikročestice s kopolimerima mliječne i glikolne kiseline (engl. *poly(lactic-co-glycolic) acid*, PLGA)), nestabilnost se očituje u promjeni načina oslobađanja lijeka, od povećanja toksičnosti zbog naglog otpuštanja lijeka ili subdoziranja zbog nepotpunog oslobađanja lijeka. Amorfne mikročestice nastoje prijeći u stanje niže strukturne energije koja je povezana sa smanjenjem entalpije i volumena (i povećanjem gustoće sustava). Strukturne relaksacije PLGA matriksa mogu mijenjati način oslobađanja lijeka zbog smanjenja difuzivnosti lijeka uvjetovanoga redukcijom gustoće polimernog matriksa. Brzina strukturnih relaksacija ovisi o temperaturi i višku strukturne energije unutar sustava (tj. o količini zaostalog nereda)(Allison, 2008).

Kristalizacija je krajnji oblik nestabilnosti čvrstih disperzija namijenjenih poboljšanju topljivosti lijeka jer se pritom bitno narušava bioraspoloživost lijeka. Staklaste suspenzije (tip 5) ili staklaste otopine (tip 6) stabilniji su sustavi jer migracija lijeka u polimeru prethodi kristalizaciji lijeka. Nestabilnost čvrstih disperzija ne obuhvaća samo pojavu kristalizacije nego bilo koju promjenu raspodjele lijeka i polimera.

#### **2.2.3.1. Gibljivost molekula u čvrstim disperzijama**

Kad su amorfni lijek i polimer homogeno pomiješani, postoji samo jedna faza. Poznato je da amorfni imaju bitno različite gibljivosti molekula ispod i iznad temperature staklišta. Uporabom polimera s visokim staklištem povisuje se i staklište novonastale čvrste disperzije, a u skladu s već opisanom Gordon-Taylor jednadžbom. Taj se pojam označava kao antiplastifikacija i jedan je od mehanizama stabilizacije čvrste disperzije.

U čvrstim disperzijama koje se sastoje od dvije faze, difuzija lijeka u matriksu bit će ograničena temperaturom staklišta matriksa, dok će sklonost kristalizaciji lijeka unutar amornog klastera ovisiti o temperaturi staklišta samog lijeka. Utjecaj polimernog matriksa na stabilizaciju bit će izražen samo na granici faza između klastera lijeka i matriksa. Jasno je da veličina izdvojene amorfne faze lijeka bitno određuje stabilnost čvrste disperzije.

#### **2.2.3.2. Inherentna sklonost kristalizaciji**

Kristalizacija se ostvaruje kroz dva koraka: nukleaciju i rast kristala. Nukleaciju potiču niže temperature, a rast kristala povećana gibljivost molekula. Brzina kristalizacije ovisi o prirodi molekule: neke su sklone stvaranju kristala (kao mnoge lipofilne molekule), neke prirodno postoje kao tekući kristali (npr. ciklosporin), a treće pak nisu sklone kristalizaciji (npr. proteini). Sklonost kristalizaciji ovisi o molekulskoj masi, obliku, kompleksnosti i orijentaciji molekula u kristalnoj rešetci (Hancock i Zografi, 1997).

#### **2.2.3.3. Omjer lijeka i polimera**

Omjer lijeka i polimera utječe na nekoliko bitnih odrednica stabilnosti čvrste disperzije. Ako postoji velika sklonost kristalizaciji lijeka, međusobna udaljenost molekula lijeka ima bitnu ulogu u inicijaciji kristalizacije, tj. što je veća njihova udaljenost, kristalizacija je neizvjesnija. Nadalje, niski udio lijeka u polimeru smanjuje rizik prekoračenja topljivosti u čvrstom stanju, tj. kad je količina lijeka veća od topljivosti lijeka u polimeru, onda postoji pokretačka snaga za razdvajanje faza (relevantno samo za djelomično mješive ili nemješive sustave). Treće, ako se upotrebljavaju polimeri s visokim  $T_g$ , onda povećani udio lijeka u smjesi utječe na snižavanje  $T_g$  smjese i potencijalno ugrožava stabilnost.

Nasuprot tome, povećani udio lijeka može djelovati i na suprotan način. Zabilježeni su slučajevi da lijek djeluje kao punilo te povećava  $T_g$  smjese bilo zbog steričkih razloga ili zbog interakcija između lijeka i polimera (Rosilio i sur., 1998). Također, ako je lijek hidrofoban, može povećati hidrofobnost polimernog matriksa umanjujući plastifikacijski učinak vode ili pak spriječiti kristalizaciju.



#### 2.2.3.4. Molekulska masa polimera

S obzirom na to da je stabilnost čvrstih disperzija uglavnom povezana s gibljivošću molekula, poželjna je uporaba polimera s visokim staklištem. Fox-Floreyova jednadžba povezuje staklište i molekulsku masu polimera:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{1}{T_g^\infty} + \frac{K}{DP},$$

gdje je  $T_g^\infty$  staklište polimera beskonačne dužine lanca,  $K$  je konstanta koja ovisi o geometriji monomera i interakcijama, a  $DP$  je stupanj polimerizacije. Općenito, polimeri veće molekulske mase tromiji su te imaju veće staklište. Stoga je primjena takvih polimera pogodnija za izradu čvrstih disperzija, a nerijetko se rade kombinacije polimera male i velike molekulske mase kako bi se postigla željena svojstva smjese (npr. smjese polivinilpirolidona i polietilenglikola) (van Drooge, 2006). Međutim, polidisperznost molekulskih masa polimera s velikim udjelom monomernih (nepročišćenih) jedinica može utjecati na povećanje gibljivosti polimera (Allison, 2008).

#### 2.2.3.5. Interakcije lijeka i polimera

Tip i razmjer interakcija polimera i lijeka u čvrstim disperzijama vrlo su bitni jer utječu na mješivost, stabilnost i način oslobađanja lijeka. Interakcije mogu biti slabe, kao npr. vodikove veze, ili jače, kao ionske interakcije ili kompleksacije. Interakcije obično utječu na povećanje  $T_g$  smjese te je potrebno dovesti više energije da bi se te interakcije prevladale i molekule počele gibati. Vodikove veze, koje vrlo često gradi polivinilpirolidon (PVP), obično pridonose fizičkoj stabilizaciji.

Međutim, još se vode polemike što zaista dovodi do stabilizacije: interakcije ili antiplastifikacijski učinak polimernog matriksa. Čvrste disperzije izrađene od monomera PVP pokazuju postojanje interakcija lijeka i polimera, ali je stabilnost izgubljena u odnosu prema polimeru PVP (van Drooge, 2006).

### 2.2.3.6. Utjecaj tehnike izrade

Tehnike izrade čvrstih disperzija (termička povijest) utječe na količinu „nereda“ zaostalog u sustavu, koji se očituje u povišenoj energiji i slobodnom volumenu. Liofilizirane čvrste disperzije izrađene brzim i sporim smrzavanjem pri niskoj i visokoj koncentraciji PLGA polimera imale su matrikse različitih fizičkih svojstava. Brzo smrznute i izrađene od razrijeđenijih otopina imale su niže i „prošireno staklište“ nego one izrađene sporijim smrzavanjem i od koncentriranijih otopina polimera. Razlike su pripisane različitim gustoćama sustava. Ista analogija vrijedi i za brzinu hlađenja pri pripravi čvrstih disperzija tehnikama taljenja (Allison, 2008).

### 2.2.4. Primjena čvrstih disperzija

U farmaciji se čvrste disperzije upotrebljavaju u pripravcima s kontroliranim oslobađanjem lijeka ili za poboljšavanje oralne bioraspoloživosti lijeka. Na tržištu je niz proizvoda na bazi kopolimera mliječne i glikolne kiseline (PLGA) u obliku mikročestica za kontrolirano oslobađanje lijeka iz polimernog matriksa (Allison, 2008):

- a) leuprolid acetat (Lupron<sup>®</sup> depo, parenteralna primjena),
- b) oktreotid (Sandostatin<sup>®</sup>, parenteralna primjena),
- c) minociklin hidroklorid (Arestin<sup>®</sup>, subgingivalna primjena u periodontalnim džepovima),
- d) risperidon (Risperdal Consta<sup>®</sup>, parenteralna primjena),
- e) naltreksen (Vivitrol<sup>®</sup>, parenteralna primjena),
- f) olanzapin (Zyyprexa<sup>®</sup>, Relprevv<sup>™</sup>, parenteralna primjena).

Vrlo velik broj novootkrivenih farmakološki aktivnih molekula pripada kategoriji slabo topljivih lijekova (skupina II, prema biofarmaceutskom klasifikacijskom sustavu). Primjenom tehnologija čvrstih disperzija uspješno su poboljšani nedostaci tih molekula.

Danas je na tržištu nekoliko lijekova u obliku čvrstih disperzija s učinkom poboljšanja topljivosti i bioraspoloživosti:

- a) s polivinilpirolidonom: nabilon (Cesamet<sup>®</sup>) i troglitazon (Rezulin<sup>®</sup>),
- b) s polietilenglikolom 5000: grizeofulvin (Gris-PEG<sup>®</sup>),
- c) s polivinilpirolidon-ko-vinilacetatom: lopinavir + ritonavir (Kaletra<sup>®</sup>),

- d) s hidroksipropilmetilcelulozom: itakonazol (Sporanax®), etravirin (Intelence®), everolimus (Certican®), nivaldipin (Nivadil®) i takrolimus (Prograf®),
- e) s hidriksipropilcelulozom i hidroksipropilmetilcelulozom: verapamil (Isoptin SR-E®) (Janssens i Van den Mooter, 2009).

### **2.2.5. Izrada čvrstih disperzija**

Prva metoda pripreme čvrstih disperzija jest taljenje (engl. *melting method*). Ono obuhvaća zagrijavanje polimera i lijeka iznad temperature tališta, njihovo miješanje i, na kraju, brzo hlađenje. Industrijska varijanta metode taljenja jest ekstruzija taljenjem (engl. *hot-melt extrusion*). Modifikacija te metode jest raspršivanje taline u rashladnoj komori, u struji hladnog zraka (engl. *spray congealing*), pri čemu se stvaraju čvrste sferične čestice koje se dalje mogu puniti, npr. u kapsule. Nedostaci te tehnike su termička razgradnja lijeka ili polimera, sublimacija ili polimorfne transformacije te nedostatna izmiješanost lijeka i polimera (engl. *level of mixing*). Prednost joj je izbjegavanje uporabe organskih otapala.

Druge metode pak podrazumijevaju primjenu otapala (engl. *solvent methods*), koja se onda iz otopine polimera i lijeka uklanjaju ispravljanjem. Praktične primjene te metode jesu sušenje raspršivanjem i liofilizacija. Sušenje raspršivanjem obuhvaća raspršivanje otopine u zagrijanome mediju, sušenje mikrokapljica i odjeljivanje nastalih mikročestica. Liofilizacija označava smrzavanje otopine lijeka i polimera, nakon kojega slijedi sublimacija otapala uz sniženi tlak. Osim toga, primjenjuju se i tehnike sušenja u fluidizirajućem sloju, gdje se otopina polimera i lijeka nanosi na pelete. Te su metode prikladnije za termolabilne tvari, a njima se ostvaruje i bolja izmiješanost lijeka i polimera. Nedostatak metode su toksična ostatna otapala koja se često moraju uklanjati sekundarnim sušenjem (Janssens i Van den Mooter, 2009).

Osim tih konvencionalnih metoda, postoji niz novih tehnika kao što su elektrostatičko vrtloženje ili uporaba superkritičnih fluida u ekstruziji taljenjem.

## **2.2.6. Karakterizacija čvrstih disperzija**

Velik broj analitičkih tehnika primjenjuje se za istraživanje čvrstog stanja lijeka i polimera unutar čvrstih disperzija. Analizom potpuno amorfnih sustava nastoji se razlučiti jesu li strukture homogene ili nehomogene.

### **2.2.6.1. Rendgenska difrakcija**

Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku omogućuje otkrivanje materijala s uređenošću dugog dosega. Monokromatska rendgenska zraka nakon sudara s rotirajućim monokristalom ili polikristalnim uzorkom difraktira u različitim smjerovima. Kristal djeluje kao trodimenzionalna difrakcijska rešetka. Prema Braggovu zakonu ( $n\lambda/2\sin\theta=d$ ), difrakcija je ekvivalentna refleksiji sa sustava paralelnih ravnina u kristalu. Kada monokromatsko zračenje pada na kristal, dijelom se reflektira s prve ravnine, a dijelom s druge. Uvjet za konstruktivnu interferenciju dviju tako dobivenih zraka jest da je njihova putna razlika jednaka cjelobrojnomo ( $n$ , red difrakcije) umnošku valnih duljina ( $\lambda$ ) zračenja,  $d$  predstavlja međuravninsku udaljenost, a  $\theta$  kut upada rendgenskog zračenja na kristalnu plohu (Filipović i Lipanović, 1985). Oštri difrakcijski „pikovi“ upućuju na sigurno postojanje kristalne faze. Međutim, s obzirom na nisku osjetljivost metode (detekcija tek više od 5% kristala, ali i ta vrijednost varira od uzorka do uzorka), izostanak oštih „pikova“ ne znači i sigurno nepostojanje kristalnih struktura (Hancock i Zografi, 1997).

### **2.2.6.2. Diferencijalna (modulirana) pretražna kalorimetrija**

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry, DSC*) obuhvaća mjerenje promjene protoka topline između posudice s uzorkom i referentne posudice kao funkcije vremena i temperature u kontroliranim uvjetima tlaka i inertne atmosfere. Temperaturni program može biti izotermički ili se temperatura može mijenjati linearno u vremenu (Verdonck i sur., 1999). Kad uzorak prolazi kroz fazne transformacije, trebat će više (ili manje) topline da uzorak ostane na istoj temperaturi (u odnosu prema referentnoj posudici). DSC instrument mjeri protok topline ( $dH/dt$ ) koji je potreban da se razlika temperatura između uzorka i referentne posude svede na nulu. Detektiraju se različiti: a) endotermni prijelazi (apsorbiraju toplinu), npr. taljenje ili dehidracija/

desolvacija, b) egzotermni prijelazi (otpuštaju toplinu), npr. kristalizacija (i razgradnja iako ne pripada u fazne prijelaze) ili c) prijelazi koji podrazumijevaju promjenu toplinskog kapaciteta kao što je staklasti prijelaz. Rezultat DSC mjerenja jest krivulja grijanja ili hlađenja koja se naziva termogramom. Prema konvenciji, endotermni se prijelazi prikazuju kao „pikovi“ (vrh okrenut prema gore). Iz termograma se mogu izračunati entalpije prijelaza integracijom „pika“ prema formuli  $\Delta H = KA$ , gdje je  $K$  kalorimetrijska konstanta, a  $A$  površina ispod „pika“. Entalpija taljenja služi za mjerenje količine kristalne tvari u uzorku.

Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *Modulated Differential Scanning Calorimetry*, MDSC) napredni je oblik DSC u kojemu je osnovni iskorak ostvaren u računalnim aplikacijama, a ne u DSC uređaju. Umjesto lineranoga, upotrebljava se sinusoidno modulirano zagrijavanje uzorka. Ukupni protok topline kombinacija je odgovora nastalih zbog promjena toplinskog kapaciteta i kinetičkih procesa. Primjerice, kad u materijalu nema nekakvih prijelaza, protok topline određen je samo toplinskim kapacitetom. U trenutku kad temperatura dosegne točku u kojoj se događa neki od prijelaza (npr. taljenje ili kristalne pretvorbe), onda protok topline nije određen samo toplinskim kapacitetom nego i energijom prijelaza. Osnovna razlika između njih je reverzibilnost procesa. MDSC može odvojiti reverzibilne od nereverzibilnih procesa. Osnova za razdvajanje je razlika u protoku topline pri moduliranome i lineranom zagrijavanju. S pomoću diskretne Fourierove transformacije ukupni se protok topline razdjeljuje na onaj koji pripada reverzibilnim i ireverzibilnim procesima. Na taj se način otkrivaju procesi koji se u termogramu ukupnog protoka topline podudaraju s nekim drugim procesima, npr. kad se staklasti prijelaz (reverzibilan) događa paralelno s gubitkom adsorbiranog otapala (ireverzibilan) (Coleman i Craig, 1996; Royall i sur., 1998).

#### **2.2.6.3. Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija**

Infracrvena spektroskopija (IR) pripada u vibracijske spektroskopije jer se temelji na činjenici da molekule titraju (vibracije istezanja i savijanja) oko ravnotežnog položaja pri specifičnim kvantiziranim energetske razinama. Svaka molekula ima karakteristične vibracije koje ovise o čvrstoćama veza i masama dijelova molekula koje vibriraju. Fourier-transformirana IR (FTIR) najčešće se upotrebljava za identifikaciju funkcionalnih skupina

unutar molekula koje se karakteristično pojavljuju na odgovarajućim vrpčama (područje funkcionalnih skupina,  $1\ 200 - 1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ ) (Pine i sur., 1984).

Spektri čvrstih disperzija služe za identifikaciju karakterističnih vrpce kristalne tvari ako se one razlikuju od amorfni oblika. FTIR se ipak najčešće rabi za utvrđivanje interakcija između polimera i lijeka. Vrlo često npr. karbonilne i hidroksilne skupine međusobno grade vodikove veze koje uzrokuju pomak karbonilne vrpce prema nižim valnim duljinama (pomak nadesno ili batokromni pomak). Taj je pomak jasna naznaka postojanja interakcije, a one mogu također uvjetovati pojavu ili nestajanje pojedinih vrpce (Wu i sur., 2009).

#### **2.2.6.4. Ramanova spektroskopija/Ramanova mikroskopija**

Tehnika je slična IR spektroskopiji i također se temelji na vibracijama molekula. Koristi se neelastičnim Ramanovim raspršenjem za prikupljanje spektroskopskih podataka. U Ramanovu i IR spektru iste vrpce obično imaju različite intenzitete, a ponekad su u jednome od tih spektara potpuno nevidljive pa su IR i Ramanova spektroskopija komplementarne tehnike. Prednost Ramanove spektroskopije jest veća osjetljivost na vodikove veze i mogućnost snimanja u vodenim otopinama. Ta spektroskopska metoda omogućuje otkrivanje grubih nehomogenosti binarnih smjesa. Mikroskopski osjetnik Ramanova mikroskopa generira kemijske mape koje omogućuju provjeru homogenosti uzorka na osnovi Ramanovih spektara (Patterson i sur., 2007).

#### **2.2.6.5. Adsorpcija vodene pare**

Adsorpcija vodene pare (engl. *water vapour sorption*) može poslužiti za razlikovanje kristalnoga od amorfno stanja. Kristali na svojim površinama obično adsorbiraju male količine vode, osim kad tvore stehiometrijske hidrate. Nasuprot njima, amorfni materijali adsorbiraju velike količine vode (čak i do 100% vlastite mase). Dodatno, gumasto stanje adsorbira više pare nego staklasto stanje. To se načelo danas iskorištava u tehnici dinamičke adsorpcije para (engl. *Dynamic Vapour Sorption, DVS*). Van Drooge i sur. (2006) istodobno su primjenjivali DVS i MDSC metode za procjenu veličine klastera amorfno

diazepama u PVP nosaču, ali se DVS tehnika pokazala preciznom samo onda kad je higroskopnost polimera bila znatno smanjena zbog prisustva hidrofobnog lijeka.

#### 2.2.6.6. Ostale tehnike

Osim navedenih, najčešće korištenih metoda za karakterizaciju čvrstog stanja disperzija, u farmaceutici se rjeđe primjenjuju tehnike navedene u tablici 2 – 4, a primarno služe za otkrivanje i karakterizaciju amorfnog stanja.

**Tablica 2 – 3.** Tehnike karakterizacije čvrstih disperzija (Hancock i Zografi, 1997; Shah i sur., 2006; Yu, 2001)

Tehnika	Informacija
nuklearna magnetna rezonancija u čvrstom stanju (engl. <i>solid state NMR</i> )	strukturne relaksacije, mikroheterogenost sustava
elektronska spinska rezonancija	strukturne relaksacije
izotermička mikrokalorimetrija	strukturne relaksacije, kinetika kristalizacije, razina kristaličnosti
kalorimetrija otopina	višak entalpije (engl. <i>excess enthalpy</i> ), razina kristaličnosti
adijabatska kalorimetrija	višak entalpije, entropije i slobodne energije
dielektrična analiza (engl. <i>dielectric analysis</i> )	strukturne relaksacije, $\alpha$ -gibanja i $\beta$ -gibanja
dinamička mehanička analiza	strukturne relaksacije
termička mehanička analiza	staklište
viskometrija	strukturne relaksacije
dilatometrija	staklište, tekući/plinoviti ekspanzijski koeficijenti
topljivost	višak slobodne energije
gustoća	razlika u gustoći kristala i amorfa
termički stimulirana struja (engl. <i>thermostimulated current</i> )	strukturne relaksacije, razina kristaličnosti, mikroheterogenost

## 2.3. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem, najkraće definirano, označava tehniku raspršivanja tekućeg supstrata (otopine, emulzije ili suspenzije) u zagrijanome mediju za sušenje (npr. u zraku ili inertnom plinu), koja rezultira uklanjanjem otapala i nastankom suhog proizvoda. Tako obrađene mikročestice nisu više samo pasivni nosači, nego su esencijalni dio terapijskog sustava koji omogućuje modulaciju oslobađanja lijeka te su njegova svojstva jednako važna kao i svojstva samog lijeka (Vehring, 2008).

Sušenje raspršivanjem sastoji se od tri osnovna koraka:

- a) raspršivanja uz pomoć raspršivača,
- b) sušenja u struji zagrijanog zraka ili inertnog plina,
- c) separacije osušenih čestica.

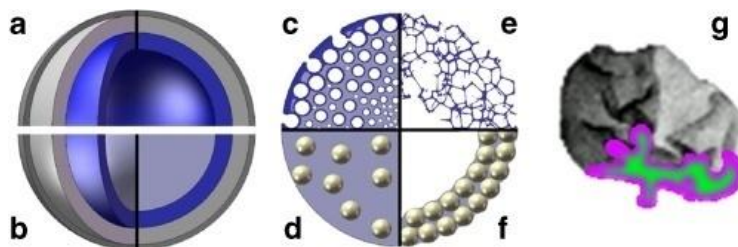
Glavni dijelovi uređaja za sušenje raspršivanjem dobro su opisani u literaturi i u ovoj disertaciji neće biti detaljnije razmatrani (Cal i Sollohub, 2010; Masters, 1985; Sollohub i Cal, 2010). Nadalje, činitelji koji određuju formiranje čvrstih mikročestica i izravno utječu na njihova fizičko-kemijska svojstva nisu u potpunosti razjašnjeni (donekle zbog tehnoloških ograničenja i nemogućnosti praćenja vrlo brzih procesa konverzije tekuće → čvrsto). Posljednjih nekoliko godina raste zanimanje za upoznavanje i upravljanje procesom formiranja čestica tijekom sušenja raspršivanjem.

### 2.3.1. Morfologija i veličina mikročestica

Mikročestice mogu imati vrlo različite oblike. Jezgra mikročestice je njezin unutarnji dio (engl. *core*), dok je ljuska ili kora (engl. *shell*) vanjski dio, dovoljno čvrst da podnese mehanički pritisak. Ovojnica (engl. *coat*) tanki je vanjski sloj bez sposobnosti održavanja čvrstog oblika. Čestice mogu imati strukturu čvrste pjene sa saćem ograničenim ovojnicom (sl. 2 – 6. c) ili šupljinama ispunjenima zrakom (sl. 2 – 6. e). Mikročestice nastale iz suspenzija najčešće poprimaju morfologije prikazane na slikama 2 – 6. d – f. U prvom slučaju suspendirana je tvar uklopljena u kontinuranu fazu i zauzima manji dio čestice. Nasuprot tome, u drugom slučaju, dispergirana faza dominira nad kontinuiranom fazom, a može graditi i kompozitne ljuske (npr. od nanočestica). Slika 2 – 6. g predložuje mikročesticu



s radijalnom raspodjelom komponenti i površinskim naborima koji tvore vanjske šupljine. Nepravilne mikročestice (engl. *irregular*) označuju one čija morfologija drastično odstupa od savršene sfere. Međutim, takve čestice i dalje mogu zadržati ukupni sferični oblik (Vehring, 2008).

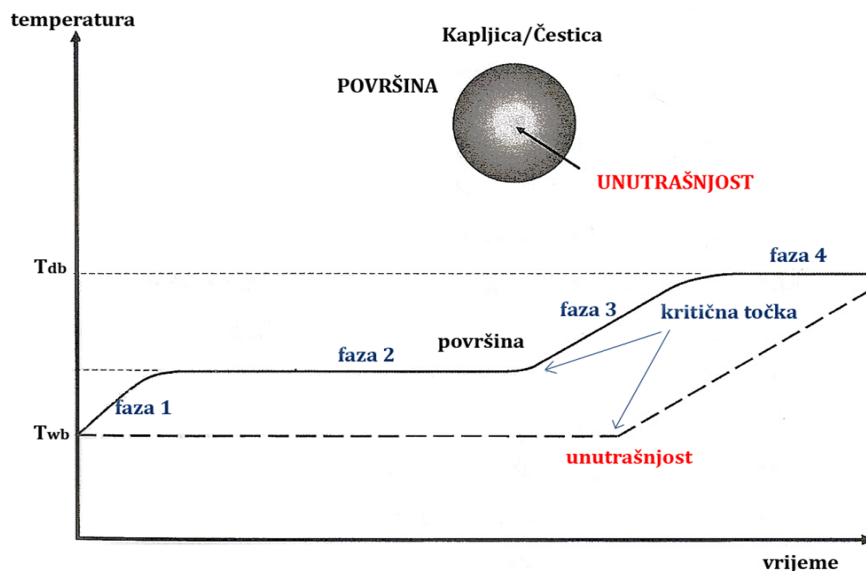


**Slika 2 – 6.** Shematski prikaz morfologija čestica: a) slojeviti, sa središnjom jezgrom; b) slojeviti sa središnjom šupljinom; c) čvrsta pjena, zatvorene saće d) čvrsta pjena, otvorene saće; e) čestice s uklopljenim nanočesticama; f) kompozitna ljuska; g) nepravilna, s eksternim šupljinama i radijalnom raspodjelom komponenti (Vehring, 2008)

Veličina čestica izravno je određena obilježjima raspršivača. Četiri su osnovna tipa: rotirajući, tlačni, ultrazvučni i raspršivači s dvije cijevi za dotok otopine za raspršivanje. Veličinu mikročestica, osim promjera raspršivača, određuju i tlak raspršivanja (veći tlak → manje čestice), koncentracija otopine za raspršivanje (veća koncentracija → veća viskoznost → veće kapljice/čestice) ili početna zasićenost otopljenih tvari (veća zasićenost → veće čestice) (Elversson i Millqvist-Fureby, 2005b).

### ***2.3.2. Nastanak čestice u procesu sušenja raspršivanjem i temperatura***

Raspršivanjem tekućine u mikrokapljice ekstremno se povećava dodirna površina između otapala i medija za sušenje, što poboljšava prijenos topline i ubrzava isparavanje otapala te nastanak čestica.



**Slika 2 – 7.** Promjene temperature kapljice/čestice tijekom sušenja raspršivanjem

Slika 2 – 7. predložuje tipičan životni ciklus mikrokapljice tijekom sušenja te daje uvid u izloženost kapljice i čestice toplini medija za sušenje. Isparavanje otapala obuhvaća dva istodobna konvekcijska procesa: a) prijenos topline između zagrijanog zraka i kapljice i b) prijenos mase isparenog otapala kroz granični sloj oko kapljice u medij za sušenje. Brzina prijenosa topline i mase ovisi o temperaturi i vlažnosti medija za sušenje, relativnoj brzini gibanja kapljica i medija za sušenje te promjeru kapljice (Masters, 1985).

U najranijem stadiju sušenja započinje isparavanje (faza 1, sl. 2 – 7) te se kapljica neznatno zagrijava. Tijekom faze 2 (sl. 2 – 7) otapalo isparava konstantnom brzinom, i to sve dok je vanjski sloj zasićen otapalom koje kontinuirano difundira iz unutrašnjosti prema površini mikrokapljice. U toj fazi sušenja površina mikrokapljice ima konstantnu temperaturu ( $T_{wb}$ , temperatura mokre kapljice; engl. *wet bulb*) koja je zbog trošenja topline na proces isparavanja niža od izlazne temperature medija za sušenje. Konstantna brzina isparavanja održava se do kritične točke koju karakterizira nastanak čvrste faze (Masters, 1985).

Nakon toga zbog povećanog otpora prijenosu mase unutar mikročestice koja očvršćuje slijedi pad brzine isparavanja otapala (faza 3, sl. 2 – 7). Posljedično, brzina prijenosa topline premašuje brzinu prijenosa mase uzrokujući porast temperature površine, a i

unutrašnjosti mikročestice. Temperatura mikročestice u završnoj fazi 4 (sl. 2 – 7) označena je kao  $T_{db}$ , temperatura suhe mikročestice (engl. *dry bulb*) i potencijalno doseže vrijednosti izlazne temperature. Produkt sušenja nikada ne postiže ulaznu temperaturu medija za sušenje te je ta tehnologija primjenjiva i za termolabilne materijale.

Zbog svega navedenog temperatura medija za sušenje smatra se jednim od vrlo bitnih procesnih parametara u procesu sušenja raspršivanjem. Temperatura izravno utječe na dinamiku ispravanja otapala, što u konačnici određuje brzinu povlačenja površine kapljice te snažno utječe na morfologiju novonastalih mikročestica (Vehring i sur., 2007).

Ulazna temperatura, tj. omjer ulazne i izlazne temperature, vrlo je bitan parametar u optimiranju iskorištenja laboratorijskih uređaja za sušenje raspršivanjem. Naime, iskorištenje procesa raste s povećanjem temperature do određene granice zbog boljeg sušenja mikročestica (niže ostatne vlage) i smanjenog zadržavanja na stijenkama cilindra. Maksimalno se iskorištenje postiže na onoj ulaznoj temperaturi koja daje izlaznu temperaturu koja ne prelazi staklište smjese polimera i lijeka koja se suši. U tom trenutku iskorištenje opet pada zbog lijepljenja gumastog materijala na stijenke cilindra (Maury i sur., 2005). Viša ulazna temperatura pokazala se pogodnijom za ostvarivanje kontroliranog oslobađanja lijeka mikročestica s PLGA polimerom (Fu i sur., 2001). Nadalje, temperatura procesa pokazala se ključnom za nastanak amorfnih mikročestica cefditoren pivoksila različitih površinskih svojstava i fizičkih stabilnosti (Ohta i Buckton, 2005).

### **2.3.3. Kompetitivni procesi tijekom sušenja raspršivanjem**

Uspješno upravljanje formiranjem čestica u procesu sušenja raspršivanjem ovisi o razumijevanju i kontroli ovih kompetitivnih procesa unutar kapljice:

- a) difuzije tvari,
- b) površinske aktivnosti,
- c) topljivosti.

Radi pojednostavnjenja rasprave o pojavama tijekom sušenja mikrokapljice, daljnja će se diskusija temeljiti na sušenju otopina kao homogenih sustava. Osnovna načela o kojima se raspravlja u daljnjem tekstu mogu se primijeniti i na složenije sustave sušenja emulzija i suspenzija, uz određene prilagodbe.

### 2.3.3.1. Nastanak čestice i difuzijski procesi

Difuzija tvari pojavljuje se u otopinama s više otopljenih tvari kad njihove koncentracije u svim dijelovima otopine nisu jednake. Tijekom sušenja mikrokapljice istodobno se događaju različiti difuzijski procesi, i to:

- a) transport otapala prema površini mikrokapljice,
- b) transport otopljenih tvari prema unutrašnjosti mikrokapljice.

Kao što je vidljivo, sila koja pokreće te difuzijske procese koncentracijski je gradijent nastao zbog isparavanja otapala i koncentriranja otopljenih tvari na površini (engl. *surface enrichment*). Brzina difuzije otopljenih tvari ovisit će o njihovoj difuzivnosti i koncentracijskom gradijentu. Difuzivnost otopljene tvari funkcija je njegove molekulske veličine prema Stokes-Einsteinovoj jednadžbi:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\mu R_0},$$

u kojoj je  $D$  difuzivnost ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $T$  temperatura (K),  $K_B$  Boltzmanova konstanta ( $1,38 \times 10^{-23} \text{J K}^{-1}$ ),  $\mu$  viskoznost ( $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), a  $R_0$  (m) promjer molekule koja difundira. Ako mikrokapljice sadržavaju više otopljenih tvari, unutar njih se može dogoditi segregacija tvari ovisno o njihovim difuzijskim brzinama. Tako se na površini mikročestica mogu očekivati one komponente koje imaju najnižu difuzivnost ili najnižu topljivost (Kim i sur., 2003). Segregacija komponenti unutar mikročestica glavna je posljedica difuzijskih procesa (Wang i Langrish, 2009). Pojave segregacije u mikročestici detaljno su istraživane u preradi mlijeka tehnikom sušenja raspršivanjem, gdje je potvrđeno da najveće komponente (masnoće i proteini) dominiraju površinom i slojevima bliskim površini mikročestica osušenog mlijeka u odnosu prema, primjerice, laktozi (Kim i sur., 2003).

Ako se zanemare interna komešanja, raspodjela komponenti unutar kapljice može se opisati nelineranom difuzijskom jednadžbom, tj. Fickovim prvim zakonom difuzije (protok tvari u otopini spontano se uspostavlja od područja više koncentracije prema području niže koncentracije). Brzina ispravanja tada je definirana jednadžbom:

$$d^2(t) = d_0^2 - \kappa t,$$

gdje su  $d$  i  $d_0$  promjer i početni promjer kapljice,  $t$  vrijeme sušenja, a  $\kappa$  brzina isparavanja.

Površina kapljice smanjuje se linerano u vremenu. Ta se jednažba primjenjuje za izračunavanje vremena sušenja ( $\tau_D$ ), koje mora biti manje od vremena zadržavanja mikročestice u ciklonu kako bi sušenje bilo potpuno:

$$\tau_D = \frac{d_0^2}{\kappa}.$$

Koncentracija tvari na površini mikročestice ( $E_i$ ) izračunava se iz transformirane difuzijske jednadžbe i označava udio tvari na površini čestice ( $c_{s,i}$ ) u odnosu prema ukupnoj količini tvari u čestici ( $c_{m,i}$ ).

$$E_i = \frac{c_{s,i}}{c_{m,i}} = \frac{\exp(0,5Pe_i)}{3\beta_i}$$

Bezdimenzionalna vrijednost  $Pe_i$ , Pecletov broj, upotrijebljen je kako bi se prethodni izraz pojednostavio:

$$Pe_i = \frac{\kappa}{8D_i},$$

a  $\beta$  je broj koji je potrebno eksperimentalno odrediti za svaku  $Pe$  vrijednost.

Za uzorke s  $Pe < 1$  difuzijsko je gibanje otopljenih tvari brzo u usporedbi s radijalnim povlačenjem površine kapljice te nastaju mikročestice s jednolikom radijalnom raspodjelom tvari. Drugim riječima, nema nakupljanja otopljenih tvari na površini mikročestice. Kad je početna zasićenost otopljenih tvari niska, trajanje sušenja je gotovo jednako vremenu potrebnome da otopljena tvar postigne točku očvšćivanja. Tada nastaju mikročestice velike gustoće.

Za uzorke s  $Pe > 1$  povlačenje površine kapljice brže je od difuzije otopljenih tvari. To dovodi do preferencijalnog nakupljanja otopljene tvari na površini novonastale mikročestice. Ovisno o prirodi istaloženih tvari, nastaju raznolike morfologije. Otopljene tvari visoke početne koncentracije (i zasićenosti) čak mogu i kristalizirati na površini mikročestica. Studije na inzulinskim mikročesticama pokazale su da visoke ulazne temperature dovode do ekstremno brzog ispravanja otapala te do nastanka površinske ljuske koja može biti propusna ili nepropusna za otapalo zaostalo u unutrašnjosti. Ako je nepropusna i elastična, nastaju velike šuplje mikročestice. Kad tlak pak postane previsok, mikročestice mogu prsnuti (Maltesen i sur., 2008).

### **2.3.3.2. Nastanak čestica i površinska aktivnost**

Ako otopina za raspršivanje sadržava površinski aktivne tvari, one prevladavaju površinom mikrokapljice nakon raspršivanja zbog svoje sklonosti adsorpciji na granici tekuće i plinske faze. Tako su Millqvist-Fureby i Smith (2007) pokazali da nakon dodatka lecitina smjesi za sušenje on dominira površinom osušene čestice. Također, raspršuje li se smjesa koja sadržava više površinski aktivnih tvari, na površini mikrokapljice nastaje kompetitivna adsorpcija te tvari s najvećim afinitetom za površine ostaju na vanjskoj plohi mikročestice.

Kompetitivna se adsorpcija može iskoristiti za mikrokapsuliranje površinski aktivnih i terapijski važnih tvari kao što su proteini (Elversson i Millqvist-Fureby, 2006; Landström i sur., 2000; Landström i sur., 2003; Maa i sur., 1998; Millqvist-Fureby i sur., 1999). *In situ* oblaganje mikročestica uz pomoć neionskih surfaktanta (npr. poloksamera) i hidroksipropilmetilceluloze s uklopljenim goveđim serumskim albuminom uspješno su proveli Elversson i Millqvist-Fureby (2006). U tom je procesu bila bitna dinamička, a ne ravnotežna adsorpcija površinski aktivnih tvari na granici faza zbog vrlo kratkog vremena sušenja kapljice (0,1 – 1 s). Morfologija mikročestica bila je povezana s elastičnošću površine kapljice tijekom sušenja raspršivanjem. Slične se metode mogu iskoristiti za dobivanje željenih svojstava prašaka kao što su poboljšano močenje i odgovarajući površinski oblici (Elversson i Millqvist-Fureby, 2005a).

### **2.3.3.3. Nastanak čestice i topljivost**

Kad se na površini mikročestice događa isparavanje, koncentracija otopljenih tvari se povećava. Promjena koncentracije pokretačka je snaga za difuzijske procese samo onda ako je koncentracija otopljene tvari manja od prezasićene otopine. Uklanjanjem otapala potencijalno najprije nastaje očvršćivanje/taloženje tvari, koje se za različite susptancije može dogoditi u različitom trenutku i na različitim udaljenostima od površine čestice. Difuzivnost ovisi o molekulskoj masi, a i topljivost je bolja u malih molekula. Općenito se može zaključiti da veće molekule brže očvršćuju i zaostaju na površini mikročestice. Naravno, topljivost pojedinih komponenata u zajedničkom otapalu može biti različita te je nemoguće predvidjeti segregaciju tvari samo na temelju molekulske mase. Evidentno je da početna zasićenost otopljene tvari drastično utječe na početak taloženja pojedine komponente u procesu sušenja raspršivanjem.

Dodatno, sušenje raspršivanjem trehaloze iz otopina različitih koncentracija dovelo je do nastanka mikročestica različitog uređenja amorfnе strukture, i to zbog različitih kinetika sušenja. Te razlike lokalne uređenosti uvjetovale su različitu stabilnost i sklonost kristalizaciji (Moran i Buckton, 2007).

### **2.3.4. Levitacijsko sušenje kapljica (engl. levitation single-droplet drying)**

Nastanak mikročestica može se proučavati uporabom levitatora, pri čemu se samo jedna kapljica održava u stanju lebdenja, u čvorištu akustičnih valova, te se pritom suši u kontroliranim uvjetima temperature i vlažnosti zraka. Iako ta metoda ima nedostataka (razlike u veličini kapljica i turbulencijama medija za sušenje) u odnosu prema stvarnim uvjetima u uređajima za sušenje raspršivanjem, rezultati istraživanja pokazali su da ima velik potencijal pri određivanju vremena/brzine sušenja (vrijeme potrebno da mikrokapljica dosegne kritičnu točku) i istraživanju nastanka mikročestica (Schiffter i Lee, 2007a; Schiffter i Lee, 2007b; Wulsten i sur., 2009).

### **2.3.5. Karakterizacija mikročestica**

Karakterizacija mikročestica najčešće obuhvaća ove parametre: iskorištenje procesa, uspješnost uklapanja lijeka, morfologiju i veličinu čestica, *in vitro* oslobađanje lijeka, analizu čvrstog stanja, analizu površine mikročestica (mjenjem specifične površine mikročestica, energije površine, poroznosti, gustoće ili analizom elementarnog sastava). S obzirom na to da su tehnike karakterizacije čvrstog stanja detaljno opisane u poglavlju 4.2.5. ovdje će biti opisane samo ostale metode bitne za mikročestične sustave.

#### **2.3.5.1. Određivanje veličine čestica metodom difrakcije laserske zrake pri niskom kutu**

Metoda difrakcije laserske zrake pri niskom kutu vrlo je česta metoda mjerenja raspodjele veličine čestica, od vrlo sitnih do velikih čestica. Metoda se može prilagoditi različitim fizikalnim oblicima uzoraka (od prašaka, suspenzija do aerosola). Monokromatska laserska svjetlost stvara usku analizatorsku zraku, koja se pri prolasku kroz uzorak ogiba (nakon sudara s česticom). Zbog velikog broja čestica u jedinici za mjerenje broj ogiba i kutova ogiba je velik pa se na detektoru stvaraju difrakcijski krugovi. Metoda se temelji na zakonitosti da je kut ogiba veći što je čestica veća. Iz izmjerenih kutova ogiba, matematičkim se transformacijama (Fraunhofer, Rayleigh, Mie) dobiva raspodjela veličine čestica (Villari i Micali, 2008).

#### **2.3.5.2. Pretražna elektronska mikroskopija**

Elektronski se mikroskop umjesto snopom svjetlosti koristi snopom elektrona, a mala duljina vala elektrona omogućuje postizanje visoke rezolucije. Na uzorak se projicira uzak snop elektrona koji se može raspršivati na uzorku ili stvarati tzv. sekundarne elektrone (elektroni što se emitiraju s površine uzorka) koji se zatim skupljaju i detektiraju uz pomoć elektroničkog uređaja. Pretražni elektronski mikroskopi upotrebljavaju se za istraživanje površina jer stvaraju detaljnu i realističnu trodimenzionalnu sliku površine objekta koji promatramo.



### 2.3.5.3. BET analiza

BET metoda (prema autorima Brunauer-Emmett-Teller) služi za analizu specifične površine uzorka, a temelji se na fizičkoj adsorpciji plina u monosloju na površini materijala, uz sljedeće pretpostavke: a) molekule plina adsorbiraju na površini u beskonačnim slojevima; b) nema interakcije između slojeva adsorbiranog plina i c) Langmuirova se teorija može primijeniti na svaki sloj. BET analiza iznimno je korisna za mikročestice neravne površine jer iste veličine čestica mogu imati bitno različite specifične površine koje onda mogu utjecati na interakciju medija za oslobađanje i samog lijeka.

### 2.3.5.4. Mjerenje poroznosti

Porozimetrija obuhvaća mjerenje različitih aspekata poroznosti materijala kao što su promjer pora, ukupni volumen pora i njihova površina. Tehnika se temelji na intruziji tekućina s niskim indeksom močivosti (npr. žive) pod visokim tlakom u uzorak. Veličina pora određuje se na osnovi tlaka potrebnoga da se materijal “ispuni” živom u odnosu prema otporu tekućine zbog površinske napetosti (Abell i sur., 1999).

### 2.3.5.5. Određivanje elementarnog sastava površine mikročestica

Fotoelektronska spektroskopija s rendgenskim zračenjem (engl. *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) nije klasična spektroskopska metoda jer ne promatra apsorpciju ili emisiju elektromagnetskog zračenja molekule već elektrone koje je molekula ispustila zbog djelovanja elektromagnetskog zračenja. Naziva se još elektronskom spektroskopijom za kemijsku analizu (engl. *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*, ESCA). Ta se tehnika primjenjuje za elementarnu analizu površina i obuhvaća atome na samo 20 – 50 Å dubine uzorka, što je kvalificira kao ekstremno osjetljivu i pogodnu za analizu površina.

Fotoelektronska spektroskopija zasniva se na fotoelektričnom efektu. Energija elektrona izbačenoga iz molekule jednaka je energiji elektromagnetskog zračenja, umanjenoj za energiju vezanja elektrona koji je izbačen te energiju vibracije i rotacije molekule. Zbog česte pojave nakupljanja lijeka na površini mikročestica tijekom njihova nastanka, ta se tehnika upotrebljava za analizu sastava površine (Dahlberg i sur., 2008; Dahlberg i sur., 2010).

### 2.3.5.6. Inverzna plinska kromatografija

Inverzna plinska kromatografija (engl. *inverse gas chromatography*, IGC) tehnika je karakterizacije tvari koja može dati informaciju o energiji površina i/ili o relativnoj površinskoj izloženosti pojedinih funkcionalnih skupina u čvrstoj tvari (Ohta i Buckton, 2005). Također nam može dati informaciju o disperzivnim komponentama energije površina i kiselo/baznim svojstvima. Tijekom IGC pokusa promjenjiva ili konstantna koncentracija poznatog plina injektira se na uzorak koji je pakiran u kolonu. Vrijeme zadržavanja poznatog plina, ovisno o svojstvima uzorka u koloni, mjeri se s pomoću tradicionalnih detektora u plinskoj kromatografiji.

IGC primjenjivana je prilikom otkrivanja uzroka različite stabilnosti dvaju amorfnih prašaka cefditoren pivoksila (s identičnim difraktogramima praha i s jednakim staklištima), sušenih raspršivanjem na različitim temperaturama, na 40 i 100 °C. Uzorci sušeni na 40 °C kristalizirali su prije nego uzorci sušeni na 100 °C. IGC analize pokazale su različite energije površina koje su prouzročile različite kinetike adorcije vode i konverzije amorfne u kristal (Ohta i Buckton, 2005). Uzorci nisu imali uređenost dugog dometa, ali je razlika u orijentaciji molekula na površini uzrokovala znatne razlike u stabilnosti amorfnih prašaka.

### 2.3.6. Primjena sušenja raspršivanjem u farmaceutici

Tehnologija sušenja raspršivanjem stara je i dobro poznata tehnika, a prvi se put spominje još davne 1860, dok su prvi patenti publicirani 1872. godine (Cal i Sollohub, 2010). Prednosti te tehnike jesu jednostavnost, kontinuirani proces i mogućnost povećanja na proizvodna mjerila. Uporaba sušenja raspršivanjem širi se 1950-ih godina i na farmaceutsku industriju. Danas se ta tehnologija primjenjuje za različite proizvode na tržištu:

- a) za izradu terapijskih sustava za poboljšanje topljivosti lijeka, npr. Intelence® (etravirin), Tibotec; Samsca™ (tolvaptan), Otsuka Pharmaceuticals Inc; Prandin® (repaglinid), NovoNordisk; Pritor® (telmisartan), Boehringer Ingelheim,
- b) za izradu terapijskih sustava za modificirano oslobađanje lijeka, npr. GLIADEL® implantat karmustina u polifeprosanu 20, Eisai Inc.,

- c) za izradu terapijskih sustava za pulmonarnu primjenu proteina, npr. EXUBERA (inzulin), Pfizer&Sanofi-Aventis, proizvod povučen s tržišta 2007. zbog komercijalnih razloga,
- d) za izradu terapijskih sustava za pulmonarnu primjenu drugih lijekova, npr. Pulmo-Spheres™ mikročestice s tobramicinom u trećoj su fazi kliničkih ispitivanja, Novartis Pharm Corp,
- e) za poboljšanje tehnoloških svojstava ekscipijensa kao što su protočnost, kompresibilnost i ujednačenost veličine čestica, npr. SuperTab 11SD, laktoza i sorbitol za direktno komprimiranje, DMW Fonterra Excipients,
- f) za stabilizaciju mikroorganizama (probiotika) i biljnih ekstrakata.

Osim toga, u farmaceutskoj se industriji sušenje raspršivanjem primjenjuje za izradu mikročestica za različite sustave, npr. za parenteralne, nazalne, topičke ili pulmonarne terapijske sustave. Intenzivno se upotrebljava u izradi mikročestica za inhalacijsku primjenu (pri čemu morfologija i veličina čestica znatno utječu na raspodjelu u dišnom sustavu i bioraspoloživost lijeka) (Lechuga-Ballesteros i sur., 2008) i pri mikrokapsuliranju proteina i peptida (radi zaštite i poboljšanja permeabilnosti), dok je nešto manje zastupljena u izradi mikročestica za kontrolirano oslobađanja lijeka. Kompleksniji terapijski sustavi obuhvaćaju mikročestice niske gustoće s kontroliranom površinskom morfologijom, naborane mikročestice s funkcionalnim slojevima ili pak mikročestice s nanočestičnim podjedinicama (Dellamary i sur., 2000; Hadinoto, 2009; Hadinoto i Cheow, 2009; Hadinoto i sur., 2007a; Hadinoto i sur., 2007b).

Mnoga istraživanja pokazuju da se sušenje raspršivanjem može primijeniti za izradu suhih emulzija, sušenje fosfolipida, izradu biorazgradljivih ili silikatnih gel mikročestica. Mikročestice izrađene radi modificiranja oslobađanja lijeka najčešće se koriste hidrofilnim polimerima (celuloznim derivatima: celuloza acetat ftalatom, natrij karoksimetil celulozom, hidroksipropilmetil celulozom, poliakrilatnom kiselinom itd.), uglavnom za nazalnu primjenu i bioadhezivne sustave (Ré, 2006) ili mikročesticama s kitozanom za uklapanje konvencionalnih lijekova, proteina i DNK molekula (Ko i sur., 2002).

### ***2.3.7. Sušenje raspršivanjem i polimetakrilni polimeri***

Izrada polimetakrilnih mikročestica tehnikom sušenja raspršivanjem opisana je prethodno u literaturi (tabl. 2 – 4 i 2 – 5). Mikročestice su izrađivane iz vodenih ili organskih sustava, u različitim procesnim uvjetima, a osnovni podaci o istraživanim svojstvima i rezultatima prikazani su idućim tablicama.

**Tablica 2 – 4.** Literaturni pregled pripravaka dobivenih sušenjem raspršivanjem Eudragit® RS polimera iz organskih otapala

<b>Autori</b>	<b>Lijek</b>	<b>Materijali</b>	<b>Cilj</b>	<b>Rezultati</b>
Otsuka i sur. (1993)	furosemid	otopina lijeka i polimera u smjesi kloroform: metanol (4 : 1); ulazna temperatura ispod $T_g$ polimera	istražiti stabilnost i funkcionalnost mikročestica s kontroliranim oslobađanje lijeka (uz analizu oslobađanja lijeka, kemije čvrstog stanja i veličine čestica)	Stabilnost čvrstih disperzija ovisila je o omjeru lijeka i polimera. Oslobađanje lijeka <i>in vitro</i> bilo je kontrolirano, ali je zamijećena i naknadna adsorpcija lijeka na polimer zbog interakcija furosemida s kvaternim amonijevim skupinama polimera.
Kristmundsdóttir i sur. (1996)	diltiazem	otopina lijeka i polimera u DCM-u; disperzija lijeka u toluenskoj otopini polimera	istražiti mogućnost pripreme mikročestica s kontroliranim oslobađanjem lijeka (uz analizu oslobađanja lijeka, kemije čvrstog stanja i veličine čestica)	Mikročestice (mikrosfere) u obliku amorfne čvrste disperzije pokazale su lošiju kontrolu oslobađanja od mikročestica (mikrokapsula) s uklopljenim kristalnim lijekom.
Pignatello i sur. (1997)	tolmetin	otopina lijeka i polimera u DCM-u; ulazna temperatura ispod $T_g$ polimera	istražiti mogućnost pripreme mikročestica s kontroliranim oslobađanjem lijeka (uz analizu oslobađanja lijeka, kemije čvrstog stanja, interakcija i veličine čestica)	Mikročestice u obliku čvrste disperzije amorfnog lijeka u polimeru nisu ostvarile kontrolirano oslobađanje lijeka uz pretpostavku velike poroznosti matriksa.
Pignatello i sur. (2001)	diflunisal	otopina lijeka i polimera u DCM-u; ulazna temperatura ispod $T_g$ polimera	istražiti utjecaj pH otopine za raspršivanje i omjer lijeka i polimera na način oslobađanja lijeka u pH 1,2 i 6,8, interakcije lijeka i polimera te pojavu kristalizacije lijeka	Mikročestice u obliku čvrste disperzije amorfnog lijeka u polimeru nisu ostvarile kontrolirano oslobađanje lijeka zbog male veličine čestica i velike kontaktne površine s medijem za oslobađanje.
Palmieri i sur. (2001)	paracetamol	lijelek otopljen u polimernoj otopini (etanol/voda)	istražiti sposobnost sušenja raspršivanjem da bi se pripravile mikročestice s kontroliranim oslobađanjem lijeka, uz variranje omjera lijeka i polimera (i analizu čvrstog stanja)	Mikročestice su bile čvrste disperzije kristalnog lijeka u polimernom matiksu, bez sposobnosti kontroliranog oslobađanja lijeka.
Hegazy i sur. (2002)	piridostigmin bromid	lijelek otopljen ili dispergirani u nepoznatom otapalu	istražiti utjecaj otapanja ili dispergiranja lijeka u polimernoj otopini na oslobađanje lijeka iz mikročestica	Mikročestice u obliku amorfne čvrste disperzije pokazale su lošiju kontrolu oslobađanja nego mikročestice s uklopljenim kristalnim lijekom.
Chen i sur. (2008)	salbutamol	lijelek otopljen u polimernoj otopini (metanol/voda)	istražiti sposobnost sušenja raspršivanjem da bi se pripravile mikročestice s kontroliranim oslobađanjem lijeka za pulmonarnu primjenu uz pomoć raspršivača s četiri kanala.	Mikročestice u obliku amorfne čvrste disperzije, s izraženim interakcijama lijeka i polimera, ostvarile su dobru kontrolu oslobađanja lijeka u medijima s različitim pH.

**Tablica 2 – 4 (nastavak).** Literaturni pregled priprava dobivenih sušenjem raspršivanjem Eudragit® RS polimera iz organskih otapala

Autori	Lijek	Materijali	Cilj	Rezultati
Sipos i sur. (2008)	diklofenak natrij	v/o/v emulzije DCM+Me <sub>2</sub> CO; DCM+MeCOEt; DCM+nPrOH; DCM+nBuOAc	istražiti termička svojstva čvrstih disperzija izrađenih iz četiri različita otapala	Otapala su imala samo manji utjecaj na termička svojstva čvrstih disperzija.
Esposito i sur. (2000)	prednizolon	etanol, etanol/voda, metanol, metanol/voda, acetonitril	istražiti utjecaj procesnih parametara (ulazne temperature, aspiratora, tlaka raspršivanja i pumpe) i formulacijskih parametara (otapala, koncentracije polimera) na veličinu i morfološka svojstva mikročestica	Otapalo je imalo najveći utjecaj na morfologiju mikročestica. Manje čestice → manja brzina pumpanja, veći tlak raspršivanja, veća ulazna temperatura. Sferične mikročestice → manja brzina pumpanja, tlak raspršivanja i ulazna temperatura bez utjecaja, veći protok zraka za sušenje.
Rassu i sur. (2008)	ketoprofen	otopina lijeka i polimera u DCM-u; ulazna temperatura ispod T <sub>g</sub> polimera	istražiti utjecaj procesnih parametara na veličinu, morfološke osobitosti i stabilnost mikročestica	Veličina čestice → pumpa i protok zraka za sušenje bez utjecaja; veća ulazna temperatura, manja veličina čestica. Morfologija → protok zraka za sušenje bez utjecaja

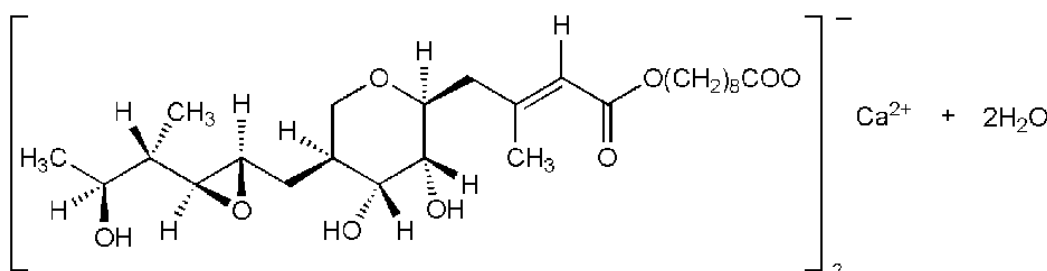
Legenda: DCM – diklorometan; Me<sub>2</sub>CO – dimetil keton; MeCOEt – metiletil keton; nPrOH – n-propanol; nBuOAc – n-butil acetat

**Tablica 2 – 5.** Literaturni pregled mikročestica dobivenih sušenjem raspršivanjem Eudragit® RS polimera iz vodenih medija

<b>Autori</b>	<b>Lijek</b>	<b>Materijali</b>	<b>Cilj</b>	<b>Rezultati</b>
Al-Zoubi i sur. (2008)	buspirion hidroklorid	lijek suspendiran u pseudolateks disperziji polimera	istražiti utjecaj omjera lijeka i polimera na kontrolu oslobađanja lijeka	Mikročestice su bile čvrste disperzije kristalnog lijeka u polimernome matriksu, bez sposobnosti kontroliranog oslobađanja lijeka.
Rattes i Oliveira (2007)	diklofenak natrij	lijek suspendiran u pseudolateks disperziji polimera	istražiti utjecaj procesnih parametara (ulazne temperature i pumpe) na mnoga svojstva mikročestica	Viša ulazna temperatura → manja vlažnost produkta, bez utjecaja na oslobađanje lijeka. Veća brzina pumpe → veće mikročestice, sporije oslobađanje lijeka.
Cortesi i sur. (2007)	aciklovir	lijek suspendiran u pseudolateks disperziji polimera	istražiti sposobnost sušenja raspršivanjem da bi se pripravile mikročestice za kontrolirano oslobađanje lijeka za okularnu primjenu	Lijek se oslobađa iz mikročestica na kontrolirani način. Testiranje virološke aktivnosti aciklovira pokazuje da mikrokapsuliranje lijeka ne umanjuje aktivnost lijeka.
Esposito i sur. (2002)	vitamin C	Korištena je vodena pseudolateks disperziji polimera.	istražiti sposobnost sušenja raspršivanjem da bi se pripravile mikročestice s kontroliranim oslobađanjem lijeka	Sferične mikročestice (<10µm) nisu ostvarile kontrolirano oslobađanje lijeka.
Palmieri i sur. (1994)	teofilin, sulfametazin	Lijekovi otopljeni u otopini (etanol/voda) ili pseudolateks disperziji polimera (voda).	istražiti utjecaj omjera lijeka i polimera na oslobađanje lijeka iz mikročestica	Sušenje raspršivanjem nijednoga od uzoraka mikročestica nije rezultiralo kontroliranim oslobađanjem.

## 2.4. Mupirocin kalcij

Mupirocin kalcij (sl. 2 – 8) topički je antibiotik koji se u farmakoterapiji primjenjuje isključivo eksterno. Kemijski je derivat pseudomonske kiseline, izolata fermentacije *Pseudomonas fluorescens*. Mupirocin kalcij ima antibakterijsko djelovanje protiv gram-pozitivnih i nekih gram-negativnih bakterija, inhibirajući reverzibilno izoleucil-transfer ribonukleinsku kiselinu, a time i bakterijsku proteinsku i RNA sintetazu (Bryskier, 2005; Parenti i sur., 1987; Ward i Campoli-Richards, 1986). Pri niskim koncentracijama djeluje bakteriostatički, dok je pri visokim koncentracijama baktericidan. Primjenjuje se u različitim pripravcima za liječenje sekundarnih infekcija traumatizirane kože zaražene *Staphylococcus aureusom* i *Streptococcus pyogenesom* te kao intranazalni pripravak za eradikaciju infekcija uzrokovanih meticilin-rezistentnim sojem *S. aureus* (skr. MRSA).



Slika 2 – 8. Mupirocin kalcij dihidrat

*In vivo* istraživanja na ljudima pokazala su da se samo 0,2 – 0,3% mupirocina apsorbira kroz intaktnu kožu (Baines i sur., 1984; Lawrence i sur., 1989), dok je penetracija nešto veća (0,2 – 0,6%) u bolesnika s psorijazom i ekcemima. Oko 2,7% aplicirane doze mupirocina penetrira u vanjske slojeve kože nakon 24 sata, a penetracija je dodatno poboljšana okluzijom (Baines i sur., 1984). Mupirocin apsorbiran u sistemske cirkulaciju veže se za proteine u vrlo visokom postotku (95%) te se na taj način inaktivira. Serumske koncentracije vrlo su kratkotrajne zbog ekstenzivnog metabolizma u inaktivni metabolit, moničnu kiselinu A, koja se stvara hidrolizom esterske veze između nukleusa i bočnog lanca molekule (Sutherland i sur., 1985).



Lijek se daje tri puta na dan tijekom trajanja terapije (do deset dana). Učestale dnevne primjene lijeka često rezultiraju slabijom suradnjom pacijenata te smanjuju izgleda za uspješan završetak terapije. Stoga je postojala opravdana potreba da se izradi pripravak za jednokratnu dnevnu primjenu lijeka koji bi omogućio produljeno oslobađanje lijeka. Slično su Amrutiya i sur. (2009). izradili mikrospužve s mupirocinom, primjenom emulzijsko-difuzijske metode, uz etilcelulozni polimer. Thakur i sur. (2008) dodatno su istraživali „scaffolde“ za produljeno oslobađanje mupirocina pri liječenju rana.

### **3. CILJ RADA**

Kontrolirano oslobađanje lijeka može se postići uporabom neutralnog estera metakrilne kiseline s malim udjelom trimetilaminoetil-metakrilat klorida, koji zbog svoje slabe topljivosti i permeabilnosti omogućuju modulirano oslobađanja lijeka. Taj je polimer komercijalno dostupan pod imenom Eudragit® RS, te će biti primjenjivan u različitim fizičkim oblicima (RS 100, RS 30D i RS 12.5). Kao modelni lijek upotrebljavat će se mupirocin kalcij.

Cilj je ovog rada ispitati kako formulacijski parametri (omjer lijeka i polimera, koncentracija smjese za sušenje raspršivanjem, vrsta otapala, fizički oblik lijeka i polimera) i procesni parametri (temperatura sušenja) utječu na formiranje poli(met)akrilnih mikročestica, njihova fizičko-kemijska svojstva i morfologiju; te razumjeti povezanost tih varijabli s načinom oslobađanja lijeka iz mikročestica. Morfologija te fizičko-kemijsko stanje lijeka i polimera unutar mikročestice izravno utječu na način oslobađanja lijeka iz mikrosustava.

Mikročestice vrlo često karakterizira početno, brzo i nekontrolirano oslobađanje lijeka (engl. *burst release*)(Allison, 2008; Yeo i Park, 2004). Takvo oslobađanje može prouzročiti toksičnost ili nepotrební gubitak dijela primijenjene doze lijeka. Najčešći razlozi te pojave jesu neodgovarajuća arhitektura ili morfologija mikročestica i nehomogena raspodjela lijeka.

Dosadašnja istraživanja sustava amonijmetakrilanih mikročestica donose neke spoznaje o povezanosti procesnih parametara i obilježja mikročestica. Povećana brzina protoka otopine za raspršivanje rezultirala je sporijim oslobađanjem lijeka, dok povećanje temperature sušenja nije imalo bitnog utjecaja na svojstva mikročestica (Esposito i sur., 2000). Nasuprot tome, neki su autori potvrdili da povećanje temperature uzrokuje smanjenje veličine čestica, kao i iskorištenja procesa (Esposito i sur., 2000). Veličina čestica također je ovisna o tipu i koncentraciji polimera. Pokazano je da vrsta otapala izravno utječe na strukturu mikročestica određujući brzinu oslobađanja (Kristmundsdóttir i sur., 1996). Nadalje, povećanje udjela polimera uzrokuje sporije oslobađanje lijeka (Al-Zoubi i sur., 2008). Međutim, ta ispitivanja ne povezuju utjecaj pojedinih procesnih parametara s načinom formiranja mikročestice i njezinim fizičko-kemijskim svojstvima, koja određuju način oslobađanja lijeka. Stoga će upravo to biti predmet ovih istraživanja.

Za određivanje učinkovitosti uklapanja lijeka u polimerni matriks, kao i za studije oslobađanja lijeka koristit će se visokotlačna tekućinska kromatografija. Istražit će se prikladne metode za ispitivanje oslobađanja lijeka iz mikročestičnih sustava te utjecaj samih medija na način oslobađanja. Morfološka istraživanja dobivenih mikročestica provodit će se uporabom pretražnoga elektronskog mikroskopa. Termičke metode (diferencijalna pretražna kalorimetrija i termogravimetrijska analiza) omogućit će uvid u fizička svojstva lijeka i polimera, njihovu međusobnu mješivost, provjeru amofnosti ili kristaličnosti, potvrditi nastanak čvrstih disperzija ili pojave separacija faza s odvojenim amorfnim ili kristalnim fazama lijeka ili polimera. Postojanje interakcija omogućit će predviđanje i objašnjenje promjene topljivosti lijeka i načina njegova oslobađanja. Termogravimetrijska analiza poslužit će za potvrdu prisutnosti i određivanje ostalih otapala upotrijebljenih u procesu sušenja raspršivanjem. Pripremljene mikročestice karakterizirat će se i primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) te difrakcije rendgenskih zraka na prahu (XRPD).

Znanstveni je doprinos predloženog istraživanja višestruk. Poznavanje načina formiranja mikromatriksa te načina kako formulacijske i procesne varijable utječu na način oslobađanja lijeka bit će od velikog značaja pri modeliranju farmakinetičkog profila lijeka te sprječavanju njegova nekontroliranog oslobađanja iz mikrosustava. Međusobna ovisnost navedenih varijabli unutar mikročestica do sada nije sustavno istraživana, a može imati velik utjecaj na kinetiku oslobađanja lijeka. Te su spoznaje od velike važnosti za razvoju naprednih ljekovitih oblika s kontroliranim oslobađanjem lijeka.

### 3.1. Specifični ciljevi rada

Glavni cilj ovog istraživanja jest pripremiti i karakterizirati poli(met)akrilne mikročestice s uklopljenim lijekom – mupirocin kalcijem. Primijenit će se metoda sušenja raspršivanjem. Specifični ciljevi rada jesu:

- a) istražiti utjecaj formulacijskih varijabli na učinkovitost uklapanja lijeka, iskorištenje procesa, brzinu oslobađanja lijeka iz mikročestica, morfologiju i veličinu čestica te svojstva čvrstog stanja (amorfnost/kristaličnost, odvajanje faza, mješivost),
- b) istražiti utjecaj procesnih varijabli na učinkovitost uklapanja lijeka, iskorištenje procesa, brzinu oslobađanja lijeka iz mikročestica, morfologiju i veličinu čestica te svojstva čvrstog stanja (amorfnost/kristaličnost, odvajanje faza, mješivost),
- c) istražiti utjecaj upotrijebljenog otapala na učinkovitost uklapanja lijeka, iskorištenje procesa, brzinu oslobađanja lijeka iz mikročestica, morfologiju i veličinu čestica te svojstva čvrstog stanja (amorfnost/kristaličnost, odvajanje faza, mješivost),
- d) istražiti utjecaj fizičkog stanja polimera i lijeka (primijenjenih u otopini ili suspenziji) na učinkovitost uklapanja lijeka, iskorištenje procesa, brzinu oslobađanja lijeka iz mikročestica, morfologiju i veličinu čestica te ostala svojstva čvrstog stanja (amorfnost/kristaličnost, odvajanje faza, mješivost),
- e) ispitati antimikrobnu djelotvornost mikročestica na sojevima *Staphylococcus aureus* radi potvrde funkcionalnosti pripremljenih mikročestica koje ostvaruju najpovoljnije *in vitro* oslobađanje lijeka,
- f) istražiti interakcije lijeka i polimera te utvrditi njihov utjecaj na oslobađanje lijeka iz polimernog nosača,
- g) povezati sve navedene procesne i formulacijske varijable s načinom formiranja mikromatriksa i ostvarivanja kontroliranog oslobađanja lijeka.

## **4. MATERIJALI I METODE**

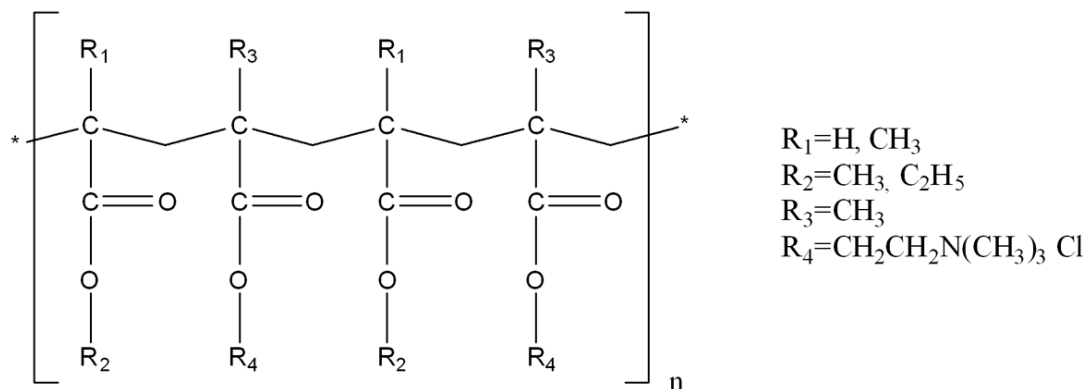
## 4.1. Materijali

### 4.1.1. Polimetakrilni polimeri

Polimerizaciju akrilnih polimera prvi su opisali Caspary i Tollens još davne 1873. godine. Industrijska primjena tih polimera nije bila široko rasprostranjena sve do kasnih 1930-ih, nakon pionirskih radova Pechmanna i Röhma. Pleksiglas, akrilni homopolimer izrađen od polimetilmetakrilata, privukao je veliku pozornost na svjetskoj izložbi 1937. godine. Zbog svoje multifunkcionalne prirode, raznovoliki svojstava i izvrsne biokompatibilnosti, ti se polimeri smatraju jednim od najbitnijih farmaceutskih ekscipijensa.

Akrilni su polimeri potpuno polimerizirani derivati akrilne i metakrilne kiseline. Fizička i kemijska stabilnost polimera uvjetovana je postojanjem kostura izrađenoga od ugljikovih atoma i bočnih metakrilnih lanaca (te skupine osiguravaju čvrstu i krutu strukturu) (sl. 4 – 1). Akrilne skupine pridonose fleksibilnosti i mekoći polimera.

U izradi ovoga doktorskog rada korišten je amonioetilni metakrilni kopolimer tipa B, tj. kopolimer estera akrilne i metakrilne kiseline s niskim sadržajem kvaternih amonijevih skupina u obliku kloridnih soli. Kvaterne su amonijeve grupe u bočnim lancima akrilnog polimera hidrofilne. Samo 5% (*m/m*) hidrofilnih skupina u tom kopolimeru, što čini jednu do dvije kvaterne amonijeve skupine na četrdeset monomernih esterskih skupina, čini te polimere netopljivima u vodi. Oni u vodi bubre, a njihovu permeabilnost specifično određuju hidrofilne skupine. Ulazak vode u polimer (tj. u polimerni matriks ili film) te difuzija otopljenog lijeka uglavnom se ostvaruju kroz hidratizirane hidrofilne kanale (Dittgen i sur., 1997). Hidrofilnost kvaterne amonijeve skupine (u obliku kloridnih soli) neovisna je o pH unutar fiziološkog raspona pH vrijednosti (od 1 do 8). Koncentracija soli utječe na način bubrenja polimera; veća ionska jakost smanjuje bubrenje polimera. Prisutnost drugih aniona, kao i puferne otopine, mogu također mijenjati način oslobađanja lijeka.



**Slika 4 - 1.** Struktura Eudragit® RS polimera

Eudragit® RS 100, Eudragit® RS 12.5 i Eudragit® RS 30D komercijalno su dostupni amonioetil metakrilni kopolimeri (Evonik, Essen, Njemačka).

#### **4.1.2. Ostali materijali**

Organska otapala metanol i tetrahidrofuran bila su odgovarajuće kvalitete za tekućinsku kromatografiju, a kalij bromid za infracrvenu spektroskopiju (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka).

Acetatni pufer (pH=5,5) pripremljen je na sljedeći način: u odmjernoj tikvici od 1 l odvagano je 5,98 g natrij acetat trihidrata te dodano 3 ml 2 N octene kiseline, a zatim je volumen dopunjen do 1 l. Za potrebe istraživanja 2 N octena kiselina pripremljena je na sljedeći način: 116 ml ledene octene kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska) razrijeđeno je vodom do 1 l.

Priprema 0,1 M amonij acetata obavljena je ovako: u odmjernu tikvicu od 2 000 ml odvagano je 15,4 g amonij acetata (Merck, Darmstadt, Njemačka), otopljeno u 1 800 ml vode te je pH korigiran ledenom octenom kiselinom (Kemika, Zagreb, Hrvatska) do 5,7, a zatim volumen dopunjen do 2 000 ml.

Polisorbat 80 (Tween 80) pribavljen je od proizvođača Uniquema (Merseyside, UK), a Mueller-Hinton podloga pribavljena je od Sigmee (München, Njemačka). U svim je pokusima upotrebljavana ultračista voda.



## 4.2. Metode

### 4.2.1. Izrada mikročestica

Mikročestice su pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem iz različitih smjesa Eudragit® RS polimera i mupirocin kalcija. Sastavi svih otopina za raspršivanje prikazani su u tablicama 4 – 1. i 4 – 2. Kada je upotrebljavan Eudragit® RS 100, prethodno je potpuno otopljen u otapalu ili smjesi otapala na ultrazvučnoj kupelji te je polimerna otopina ostavljena stajati 24 sata kako bi se postiglo potpuno raspletanje polimernih lanaca. Mupirocin kalcij otopljen je u otopini polimera neposredno prije sušenja raspršivanjem. Uzorak IVc izrađen je od prethodno amorfiziranog lijeka osušenoga raspršivanjem iz 2-postotne ( $m/m$ ) metanolne otopine kristalnog mupirocin kalcij dihidrata. Za ostale pokuse upotrebljavani su komercijalno dostupni Eudragit® RS 30D (30-postotna vodena koloidna disperzija polimera) i Eudragit® RS 12.5 (12,5-postotna otopina polimera u smjesi acetona i izopropanola). Uzorci Id, Ie, IVd i IVe pripremljeni su suspendiranjem lijeka u otopini ili disperziji polimera dodatkom polisorbata 80, a raspršivani su uz kontinuirano miješanje.

Sušenje raspršivanjem provedeno je na uređaju Büchi B-290 mini spray drier (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska) s ukapljivačem otpadnih otapala (Inert Loop B-295), koji je omogućio siguran rad s organskim otapalima. Uređaj radi na načelu istosmjernog strujanja medija za sušenje (zraka ili inertnog plina) i samog proizvoda, s integriranim raspršivačem promjera 0,7 mm. Otopina je raspršena u sitne kapljice s pomoću komprimiranog dušika, a one su zatim sušene u cilindru i odvojene u ciklonu. Radi unaprjeđenja iskorištenja procesa upotrijebljen je mali visokoučinkoviti ciklon, koji se svojim dimenzijama i geometrijom razlikuje od standardnog ciklona (uže tijelo ciklona s užim izlaznim otvorom). Konstantni parametri procesa sušenja bili su:

- a) aspirator: 85% maksimalne vrijednosti,
- b) pumpa: 40% maksimalne vrijednosti,
- c) tlak raspršivača: 55 mm (670 Nl/h).

Ulazna temperatura varirana je za različite pokuse, a vrijednosti su navedene u tablicama 4 – 1. i 4 – 2.

**Tablica 4 – 1.** Sušenje raspršivanjem iz otopina – sastav otopina za raspršivanje i procesni parametri

Mikročestice	Sastav otopina za sušenje raspršivanjem					Ulazna temperatura (°C)
	Omjer lijeka i polimera [m : m]	Ukupna konc. lijeka i polimera [% , m/m]	Fizički oblik lijeka	Fizički oblik polimera	Otapalo	
I	1 : 5	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
II	1 : 2	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
III	1 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
IV	2 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
V	5 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
IV-110	2 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	110 °C
IV-100	2 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
IV-90	2 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	90 °C
IV-80	2 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	80 °C
IV-70	2 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	70 °C
IV-1%	2 : 1	1	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
IV-2%	2 : 1	2	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
IV-3%	2 : 1	3	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
IV-4%	2 : 1	4	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C
IV-5%	2 : 1	5	otopljen	otopljen <sup>1</sup>	metanol	100 °C

<sup>1</sup> Korišten je polimer Eudragit® RS 100.

Amorfni je lijek dobiven sušenjem raspršivanjem iz 2-postotne (m/m) metanolne otopine, uz jednake procesne parametre sušenja kao i mikročestice te na ulaznoj temperaturi od 100 °C. Na isti je način pripravljen i osušeni polimer. Svi su prašci čuvani u staklenim spremnicima, u desikatoru, na sobnoj temperaturi.

**Tablica 4 – 2.** Sušenje raspršivanjem iz otopina i suspenzija – sastav otopina/suspenzija za raspršivanje i procesni parametri

Mikročestice	Sastav otopina za sušenje raspršivanjem					Ulazna temperatura (°C)
	Omjer lijeka i polimera [m : m]	Ukupna konc. lijeka i polimera [% , m/m]	Fizički oblik lijeka	Fizički oblik polimera	Otapalo	
Ia	1 : 5	3	otopljen	otopljen	metanol	110 °C
Ib	1 : 5	3	otopljen	otopljen	metanol : etanol = 50 : 50 (m/m)	110 °C
Ic	1 : 5	3	otopljen	otopljen <sup>2</sup>	acetone : izopropanol = 40 : 60 (m/m)	110 °C
Id	1 : 5	3	suspendiran, djelomično otopljen	otopljen	acetone : izopropanol = 40 : 60 (m/m)	110 °C
Ie	1 : 5	3	suspendiran, djelomično otopljen	koloidna disperzija <sup>3</sup>	voda	110 °C
IVa	2 : 1	3	otopljen	otopljen	metanol : etanol = 50 : 50 (m/m)	110 °C
IVb	2 : 1	3	otopljen	otopljen	metanol : etanol = 50 : 50 (m/m)	110 °C
IVc <sup>4</sup>	2 : 1	3	otopljen <sup>1</sup>	otopljen	acetone : izopropanol = 40 : 60 (m/m)	110 °C
IVd	2 : 1	3	suspendiran, djelomično otopljen	otopljen <sup>2</sup>	acetone : izopropanol = 40 : 60 (m/m)	110 °C
IVe	2 : 1	3	suspendiran, djelomično otopljen	koloidna disperzija <sup>3</sup>	voda	110 °C

<sup>1</sup> Mupirocin kalcij prethodno je amorfiziran (sušenjem raspršivanjem) kako bi se postigla zadovoljavajuća topljivost lijeka

<sup>2</sup> Korišten je komercijalno dostupan Eudragit® RS 12.5.

<sup>3</sup> Korišten je komercijalno dostupan Eudragit® RS 30D.

<sup>4</sup> Topljivost mupirocin kalcij dihidrata nije bila dostatna za pripravu uzoraka te je upotrijebljen amorfni oblik mupirocin kalcija.

#### **4.2.2. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u mikročestice**

Sadržaj mupirocin kalcija određen je HPLC metodom, koja je opisana u američkoj farmakopeji (United States Pharmacopeia, USP, 31. izd., sv. 2, 2009). Odgovarajuća količina mikročestica s koncentracijom lijeka od 0,1 mg/ml otapana je na ultrazvučnoj kupelji (Julabo USR3, Julabo Labortechnik GmbH, Sellbach, Njemačka), u metanolu, tijekom 30 minuta. Kromatografska analiza sadržaja lijeka provedena je instrumentom Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) s detektorom s nizom dioda. Mobilna se faza sastojala od degazirane i filtrirane smjese 0,1 M amonij acetata i tetrahidrofurana u omjeru 68 : 32. Protok mobilne faze bio je 1 ml/min. Temperatura kolone (Zorbax Eclipse XDB C8, 250 x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm, Agilent, Palo Alto, CA, SAD) s odgovarajućom pretkolonom (Symmetry C8, veličina čestica 5 µm, 3,9 x 20 mm, Waters, Dublin, Irska) bila je 35 °C. Volumen injektiranja bio je 20 µl. Izokratno eluiranje trajalo je 10 minuta. Svi su pokusi provedeni u triplicatu, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti. Uklapanje lijeka izraženo je kao maseni udio (*m/m*) lijeka u mikročesticama prema formuli:

$$UU = \frac{\text{teoretska količina lijeka} - \text{pronađena količina lijeka}}{\text{teoretska količina lijeka}} \times 100.$$

#### **4.2.3. In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica**

Ispitivanje oslobađanja lijeka provedeno je na USP Aparaturi 2 s lopaticama (uređaj PharmaTest tip PTWS, PharmaTest Apparatebau GmbH, Hainburg, Njemačka). Određena količina mikročestica stavljena je u 500 ml degaziranoga acetatnog pufera pH=5,5 na 37±0,5 °C kako bi se ostvarila ciljanja koncentracija od 0,1 mg/ml. Brzina okretanja lopatica bila je 20 okr./min. U određenim vremenskim intervalima uzorkovano je po 5 ml otopine, koja je filtrirana (Acrodisc® GF 25 mm filteri sa GF/0.45 GHP membranama, Pall, Bad Kreuznach, Njemačka) i analizirana HPLC metodom za sadržaj mupirocin kalcija (prethodno opisana u poglavlju 4.2.2.). Uzorkovane su količine nadomještene novim

medijem zagrijanim na 37 °C. Količina mikročestica određena je tako da se osiguraju uvjeti potpune topljivosti lijeka u zadanom pH mediju (topljivost amorfnog mupirocin kalcija u acetatnom puferu pH=5,5 veća je od 20 mg/ml). Sve su analize provedene po tri puta.

#### **4.2.4. Određivanje veličina čestica**

Mjerenje veličina čestica provedeno je metodom difrakcije laserske zrake pri malom kutu na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Primijenjena je vlažna metoda pa su mikročestice prije analize dispergirane u vodi (disperzijski medij) s nekoliko kapi 1-postotne (*m/m*) otopine polisorbata 80. Uzorak je mjeren u disperzijskoj jedinici (Hydro 2000 $\mu$ P), uz zasjenjenje od 8 – 15%. Eksperimentalni su uvjeti bili sljedeći: vrijeme mjerenja – 1 minuta; miješalica – kontinuirano 2 000 okr./min; ultrazvučna miješalica – 10% nominalne vrijednosti; broj mjerenja – 6. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

#### **4.2.5. Karakterizacija čvrstog stanja**

##### **4.2.5.1. Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija (MDSC)**

Termička su svojstva analizirana uz pomoć TA Instrument modulated DSC Q1000 kalorimetra (TA Instruments, New Castle, SAD) primjenom aluminijske hermetičke posudice s probušenim poklopcem (da se omogući uklanjanje ostatnog otapala) s oko 2 – 5 mg uzorka u atmosferi dušika (50 ml/min). Uzorci su grijani 5 °C/min od 20 °C do 200 °C, uz modulaciju  $\pm 0,8$  °C (amplituda) svakih 60 sekundi (period). Staklište ( $T_g$ ) određeno je s pomoću računalnog programa TA universal analyses ekstrapoliranjem linernog dijela MDSC krivulje ispod i iznad staklišta, uz određivanje središnje temperature u krivulji reverzibilnog protoka topline. Sve su analize provedene u triplikatu.

Dodatno, uzroci su podvrgnuti cikličnom zagrijavanju (grijanje – hlađenje – grijanje): grijanju do 200 °C, hlađenju do 20 °C pod kontroliranim uvjetima (brzinom 5 °C/min), nakon čega je slijedio drugi ciklus zagrijavanja od 20 °C do 200 °C pri 5 °C/min i modulaciju  $\pm 0,8$  °C svakih 60 sekundi u svakom koraku. Takav način snimanja termograma omogućuje

uklanjanje ostatnog otapala iz mikročestica i određivanje stvarnog staklišta ( $T_g'$ ). Svaka je analiza provedena u triplikatu.

#### **4.2.5.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)**

Za provedbu termogravimetrijske analize u platinastim posudicama s približno 5 mg uzorka, u struji dušika (35 ml/min), uz brzinu grijanja 10 °C/min, u temperaturnom rasponu od 30 °C do 250 °C upotrijebljen je TGA-7 termogravimetar (PerkinElmer, Norwalk, SAD). Te su analize omogućile kvantificiranje ukupne količine ostatnih hlapljivih otapala. Svaka je analiza provedena je u triplikatu.

#### **4.2.5.3. Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR)**

Infracrveni spektri snimljeni su na Nicolet 6700 FTIR (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, SAD) uređaju s brzo obnovljivim deuteriranim triglicin sulfatnim (DTGS) detektorom, KBr metodom (s približno 0,5% uzroka), uz pomoć računalnog programa Omnic, verzija 4.1. Spektralni raspon od 400 do 4 000  $\text{cm}^{-1}$ , rezolucija 4  $\text{cm}^{-1}$  i akumulacija od 32 snimke omogućili su snimanje kvalitetnih spektara.

#### **4.2.5.4. Fourier-transformirana Ramanova spektroskopija (FT Raman)**

Ramanovi spektri snimljeni su na Nicolet 6700 FTIR spektrofotomeru s NXR FT-Ramanovim modulom (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, SAD), opremljenim s 1 064 nm Nd:YVO<sub>4</sub> ekscitacijskim laserom, CaF<sub>2</sub> djeliteljem zraka i Ge detektorom. Podaci su obrađeni uz pomoć računalnog programa Omnic, verzija 4.1. Korišten je spektralni raspon od 3 700 do 400  $\text{cm}^{-1}$ , s rezolucijom 4  $\text{cm}^{-1}$  i akumulacijom od 128 snimaka.

#### **4.2.5.5. Rendgenska difrakcija**

Difraktogrami praha snimani su na Philips X'Pert PRO difraktometru (PAN Analytical, Kassel Waldau, Njemačka), opremljenom X'Celerator detektorom (2 022° 2 $\theta$ ) uz CuK $\alpha$  radijaciju pri 45 kV i 40 mV. Kut snimanja (2 $\theta$ ) bio je 2-50°, korak (2 $\theta$ ) bio je 0,017°, a vrijeme po koraku 50 sekundi. Uzorak je smrvljen u tarioniku, a zatim nanesen na originalni

Phillipsov nosač (promjera 16 mm), ručno pritisnut špatulom i zatvoren drugom pločicom. Difraktogrami su interpretirani uz pomoć računalnog programa X'Pert Data Collector.

#### **4.2.6. Morfološka karakterizacija mikročestica**

##### **4.2.6.1. Pretražna elektronska mikroskopija**

Morfologija mikročestica analizirana je uz pomoć pretražnoga elektronskog mikroskopa (JEOL, tip JSM-5800, Tokio, Japan). Uzroci su pričvršćeni na ljepljivu traku te obloženi tankim slojem zlata u vakuumu. Mikroskop je radio pod naponom od 15kV.

#### **4.2.7. Antimikrobna djelotvornost mikročestica**

Antimikrobna djelotvornost mikročestica s mupirocin kalcijem određena je i uspoređena s antimikrobnom djelotvornošću samog lijeka i praznih mikročestica. Mikročestice su suspendirane u acetatnom puferu pH=5,5 (USP pufer, medij za analizu *in vitro* oslobađanja lijeka iz mikročestica) neposredno prije analize, u konačnoj koncentraciji od 400 µg/ml. Paralelno su analizirani uzorci dobiveni nakon trosatnog pokusa *in vitro* oslobađanja lijeka iz mikročestica kako bi se utvrdilo utječe li postupak mikrokapsuliranja negativno na aktivnost lijeka.

Antimikrobna djelotvornost testirana je na soju vrste *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) metodom dvostruke mikrodilucije provedeno je u skladu sa CLSI smjernicama (2001) na Müller-Hintonovom bujonu. Inokulum od  $1 - 2 \times 10^8$  cfu/ml pripremljen je i razrijeđen do konačne koncentracije od  $1 - 2 \times 10^5$  cfu/ml u podlozi s lijekom, mikročesticama i lijekom oslobođenim iz mikročestica nakon tri sata. Metodom dvostruke mikrodilucije na mikrotitarskoj ploči testirane su koncentracije lijeka u rasponu od 0,625 do 256 µg/ml. Kao pozitivna (kontrola rasta) i negativna kontrola (kontrola sterilnosti) korišten je bujon s i bez kulture *S. aureus*. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najmanja koncentracija mupirocin kalcija koja je inhibirala vidljivi bakterijski rast nakon 18 sati inkubacije na  $35 \pm 2$  °C. Nakon 3, 6 i 18 sati, razrjeđenja (10 µl) nasadena su na Müller-Hintonove agarne ploče, a broj ukupno

naraslih kolonija zabilježen je nakon 18 sati inkubacije na  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Minimalna baktericidna koncentracija određena je kao najniža koncentracija uzoraka s mupirocin kalcijem pri kojoj je broj *S. aureus* kolonija smanjen za 99% početnog inokuluma. Svi su eksperimenti provedeni po tri puta.

#### **4.2.7.1. Dinamika uginuća bakterija djelovanjem lijeka u vremenu (engl. *time-kill study*)**

Studija dinamike uginuća bakterija djelovanjem lijeka u vremenu provedena je na *S. aureus* (ATCC 29213) i klinički izoliranome meticilin rezistentnom soju *S. aureus* (MRSA). Kao početni inokulum korištena je bakterijska koncentracija od 6,1 – 6,5 log cfu/ml na mikrotitrskoj ploči. Mupirocin kalcij uzorci u koncentraciji od 16 µg/ml i 8 µg/ml bili su inkubirani sojevima *S. aureus* tijekom 3, 6 i 24 sata na  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, pripremljena su 10-struka razrjeđenja u Müeller-Hintonovom bujonu te je po 10 µl iz svakog razrjeđenja nasađeno na Müeller-Hinton agar. Bakterijske su kolonije prebrojene nakon 18 sati inkubacije na  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Svi su pokusi napravljeni tri puta.

#### **4.2.8. Statistička analiza**

Numerički su rezultati izraženi kao srednja vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD), ako nije drugačije naznačeno. Eksperimentalni su rezultati uspoređeni primjenom jednosmjerne analize varijance. *Post-hoc* usporedba sredina provedena je primjenom Tukeyeva testa, uz razinu značajnosti manju od 0,05 ( $P < 0,05$ ). Matematičko modeliranje krivulja oslobađanja lijeka iz mikročestica provedeno je primjenom monoeksponencijalnih i biekspencijalnih jednadžbi uz pomoć računalnog programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, SAD, [www.graphpad.co](http://www.graphpad.co)). Matematičko modeliranje primjenom biekspencijalnih jednadžbi omogućuje razdvajanje brze i spore faze oslobađanja lijeka te njihovu međusobnu usporedbu (Beck i sur., 2007; Cruz i sur., 2006; Lionzo i sur., 2007; Raffin i sur., 2006).



## **5. REZULTATI I RASPRAVA**

## **5.1. Utjecaj omjera lijeka i polimera na svojstva mikročestica**

### 5.1.1. Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka

Kako bi se istražio utjecaj omjera lijeka i polimera na svojstva mikročestica, pripremljeni su uzorci navedeni u tablici 5 – 1.

**Tablica 5 – 1.** Svojstva mikročestica s različitim omjerima lijeka i polimera (*m/m*) sušenih raspršivanjem na 100 °C

Mikročestice [lijek : polimer, <i>m/m</i> ]	Iskorištenje procesa [%]	Sadržaj lijeka u mikročesticama [% ± SD]	Uspješnost uklapanja lijeka [% ± SD]
I (1 : 5)	53,7	15,7 ± 0,1	99,9 ± 0,5
II (1 : 2)	57,2	31,7 ± 0,2	100,8 ± 0,7
III (1 : 1)	59,4	47,6 ± 0,7	100,8 ± 1,5
IV (2 : 1)	55,9	63,7 ± 1,4	101,1 ± 2,3
V (5 : 1)	57,1	78,1 ± 2,8	99,1 ± 3,6

Legenda:

iskorištenje procesa (%) – omjer mase dobivenih mikročestica i mase ukupnih sastojaka dodanih u otopinu za raspršivanje; uspješnost uklapanje lijeka (% *m/m*) – omjer stvarnoga i teoretskog sadržaja mupirocin kalcija u mikročesticama; SD – standardna devijacija (n=3)

Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem variralo je između 53 i 59%. U preliminaranim studijama sušenja prilagodbom tehnoloških parametara spriječeno je odlaganje materijala na stijenka cilindra (npr. smanjenjem brzine pumpanja), čime su postignuta relativno visoka iskorištenja. Iskorištenje je dodatno poboljšano uporabom ciklona sa suženim izlaznim otvorom koji je sprječavao gubitak najlakših i najmanjih čestica. Naime, prema Maury i sur. (2005) ciklon sa suženim promjerom te užim izlaznim otvorom može odvajati čestice manje od 0,44 µm, za razliku od standardnog ciklona koji može odvajati čestice veće od 1,43 µm. Geometrija užeg ciklona uzrokuje smanjenje volumnog protoka medija za sušenje (u ovom primjeru dušika) i dovodi do većeg pada tlaka duž ciklona, što pogoduje boljem odvajanju čestica. Neznatno slabije iskorištenje (53,7%) ostvareno je na uzorku s najmanjom količinom lijeka (mikročestice I). Kao što će se vidjeti

kasnije, te su čestice bile najmanje te su gubici kroz izlazni otvor ciklona bili veći.

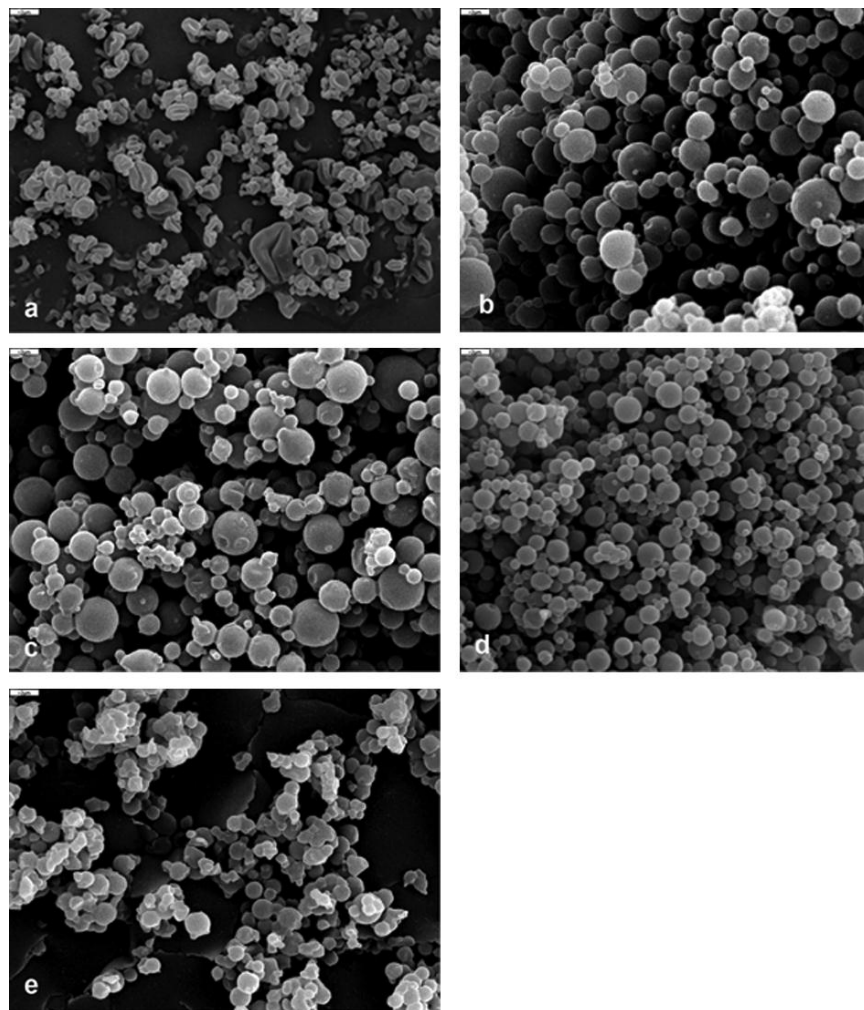
Sadržaj lijeka unutar mikročestica odgovarao je teoretskim udjelima, što potvrđuje da je uklapanje lijeka za sve pripremljene mikročestice, neovisno o sastavu, bilo gotovo 100-postotno. Uspješnost uklapanja lijeka kretala se između 99,1 i 101,1% (tabl. 5 – 1), bez značajne statističke razlike ( $P>0,05$ ) među analiziranim uzorcima. Općenito, bolja topljivost lijeka u određenom otapalu jamči bolje uklapanje lijeka (Wang i Wang, 2002a). Uspješno uklapanje lijeka unutar polimernih mikročestica povezuje se i s prirodom početne smjese za raspršivanje. Naime ako je početna smjesa za raspršivanje otopina, postoji velika vjerojatnost da će mikrokapljice nastale nakon raspršivanja zadržati svoju inherentnu homogenost (u smislu omjera lijeka i polimera). Zbog toga stvarni udio lijeka unutar polimernih mikročestica vrlo često odgovara teoretskim vrijednostima, što je i potvrđeno mnogim literaturnim rezultatima (Pignatello i sur., 1997; Rassu i sur., 2008; Wang i Wang, 2002a; Wang i Wang, 2002b). Zbog isparavanja otapala i nastalog koncentracijskoga gradijenta unutar mikrokapljice te različite difuzivnosti otopljenih tvari ili njihove površinske aktivnosti, u konačno formiranoj mikročestici može doći do razdvajanja polimera i lijeka te narušavanja homogenosti otopine iz koje čestica nastaje (Vehring, 2008).

### ***5.1.2. Morfologija mikročestica***

Mikročestice su bile u obliku finoga, sipkog praška. Slika 5 – 1. prikazuje snimke mikročestica napravljene uz pomoć pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM). Slike 5 – 1. a) i e) predaju mikročestice s najmanjim i najvećim udjelom lijeka. Vidljivo je da morfologija tih mikročestica bitno odstupa od pravilnih sferičnih oblika. Mikročestice s najmanjim udjelom lijeka naborane su, smežurane i jako deformirane. Mikročestice s najviše lijeka također su nepravilnog oblika, poneke su ravnih rubova i ploha, ali se sferični oblik ipak naslućuje. Ostale prikazane mikročestice (sl. 5 – 1. b – d) pravilnog su, sferičnog oblika, glatke, bez vidljivih pora i drugih površinskih nepravilnosti. Na samim mikročesticama ili izvan njih nema vidljivih kristala lijeka.

Površina mikročestica općenito je glatka kad polimer očvršćuje polako i kad ima dovoljno vremena da se mikrokapljica sažme (skupi), što se najčešće događa zbog sporog

uklanjanja otapala ili dobre topljivosti (niske ukupne zasićenosti) otopljenih tvari u korištenom otapalu (Bain i sur., 1999; Mandal i sur., 2001). Visoka zasićenost polimera ili lijeka u otopini za raspršivanje pogoduje ranim faznim transformacijama (otopina > gel > krutina) u procesu sušenja mikrokapljice, koje onda rezultiraju raznolikim morfologijama. Visoka koncentracija (i zasićenost) polimera u mikrokapljici s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*) (sl. 5 – 1. a) dovela je do naboravanja mikročestica, vjerojatno zbog ranog taloženja polimera na površini mikrokapljice, te do stvaranja mekane i tanke kore koja se u konačnici naborala zbog niske čvrstoće (Vehring, 2008). Vidljivo je da je pri tome udio lijeka (a samim time i njegova početna zasićenost) bitno utjecao na izgled mikročestica.



**Slika 5 – 1.** SEM slike mikročestica s različitim omjerom lijeka i polimera  
a) I (1 : 5); b) II (1 : 2); c) III (1 : 1); d) IV (1 : 2); e) V (5 : 1) (*m/m*)

### 5.1.3. Veličina čestica

Volumna raspodjela veličine čestica prikazana je u tablici 5 – 2. Mala veličina čestica može se pripisati niskoj viskoznosti otopine za raspršivanje (zbog niskih koncentracija otopljenih tvari) i visokom tlaku za raspršivanje otopine. Dobiveni rezultati pokazuju da veličina čestica raste s udjelom lijeka. Međutim, ako se rezultati tih analiza tumače zajedno sa SEM slikama, očito je da mikročestice ne prate takav trend, nego da je povećanje  $d(0,9)$  vrijednosti zapravo doprinos aglomerata u volumnoj raspodjeli veličine čestica. SEM snimke (sl. 5 – 1. a – e) pokazuju da je samo mali broj mikročestica spojen te da je aglomeracija nastala nakon završetka sušenja.

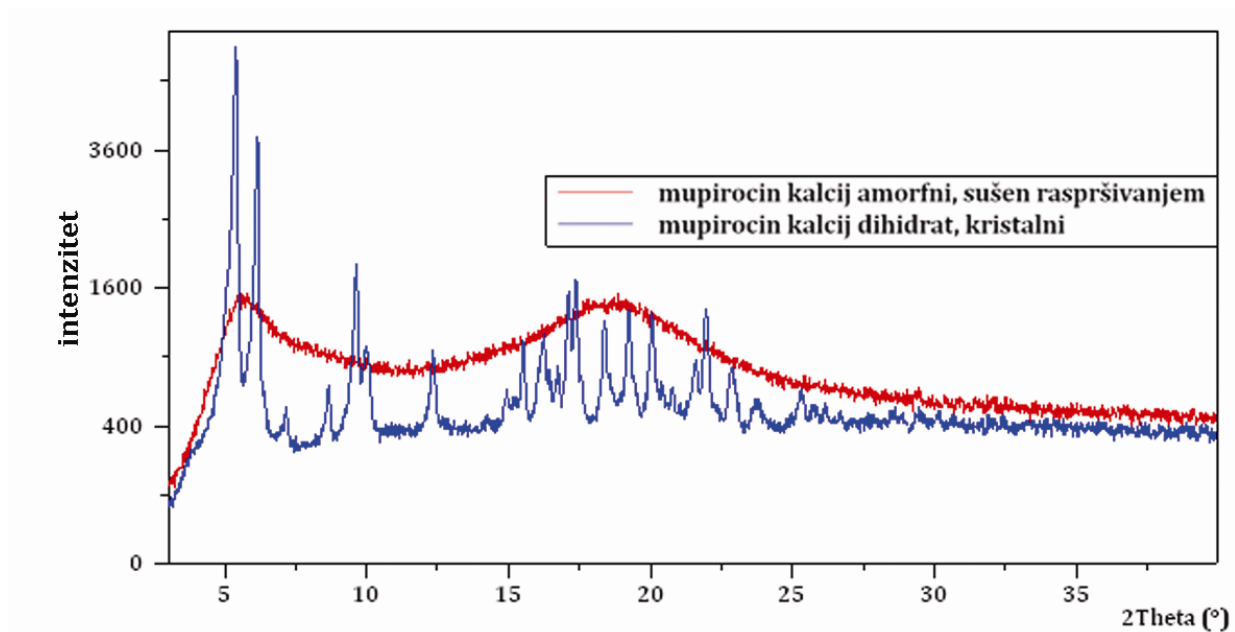
**Tablica 5 – 2.** Volumna raspodjela veličine čestica uzoraka s različitim omjerima lijeka i polimera ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem na 100 °C

Mikročestice [lijevak : polimer, $m/m$ ]	Raspodjela veličine čestica [ $\mu m \pm SD$ ]		
	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
I (1 : 5)	1,2 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 0,0	3,7 $\pm$ 0,3
II (1 : 2)	1,4 $\pm$ 0,0	2,8 $\pm$ 0,0	6,1 $\pm$ 0,0
III (1 : 1)	1,5 $\pm$ 0,0	3,2 $\pm$ 0,0	8,9 $\pm$ 0,1
IV (2 : 1)	1,2 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,0	10,6 $\pm$ 0,2
V (5 : 1)	0,2 $\pm$ 0,0	2,8 $\pm$ 0,0	11,2 $\pm$ 0,1

Legenda: d(0,1), d(0,5) i d(0,9) označava da je 10, 50 i 90% volumne raspodjele mikročestica ispod navedene vrijednosti; SD – standardna devijacija (n=6)

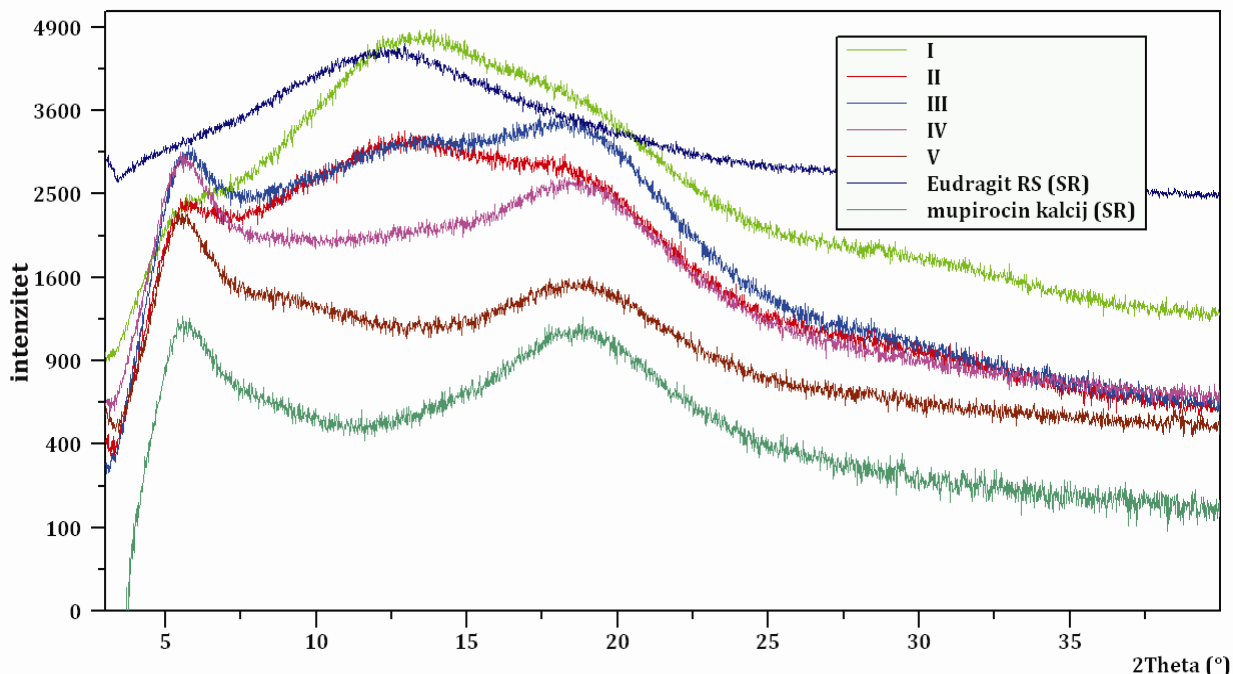
### 5.1.4. Rendgenska difrakcija mikročestica

Difraktogrami izvornog lijeka (kristalni, dihidratni oblik) i onoga dobivenog sušenjem raspršivanjem (amorfni) prikazani su na slici 5 – 2. Difraktogrami mikročestica s različitim omjerom lijeka i polimera te amornog lijeka i polimera prikazani su na slici 5 – 3. Vidljivo je da je nakon sušenja raspršivanjem lijek prešao iz kristalnoga u amorfni oblik izgubivši svoju pravilno strukturiranu kristalnu rešetku. Na snimkama su vidljivi halo difraktogrami tipični za amorfne tvari.



**Slika 5 – 2.** Difraktogram lijeka u izvornom obliku (kristalni) i onoga dobivenog sušenjem raspršivanjem (amorfni)

Difraktogrami (sl. 5 – 3) pokazuju da su sve mikročestice u amorfnom stanju, bez „pikova“ kristalne forme. Amorfni halo difraktogami pojedinih mikročestica međusobno su različiti zbog različitih udjela lijeka i polimera. Kako udio lijeka raste, halo difraktogram mikročestice postaje sličniji halo difraktogramu samog lijeka, i obratno. Provedene analize upućuju na činjenicu da su mikročestice izrađene od smjese amorfa lijeka i polimera u obliku čvrste disperzije. Amorfizacija lijeka posljedica je brzog taloženja u kratkome vremenskom razdoblju, što je onemogućilo proces kristalizacije lijeka.



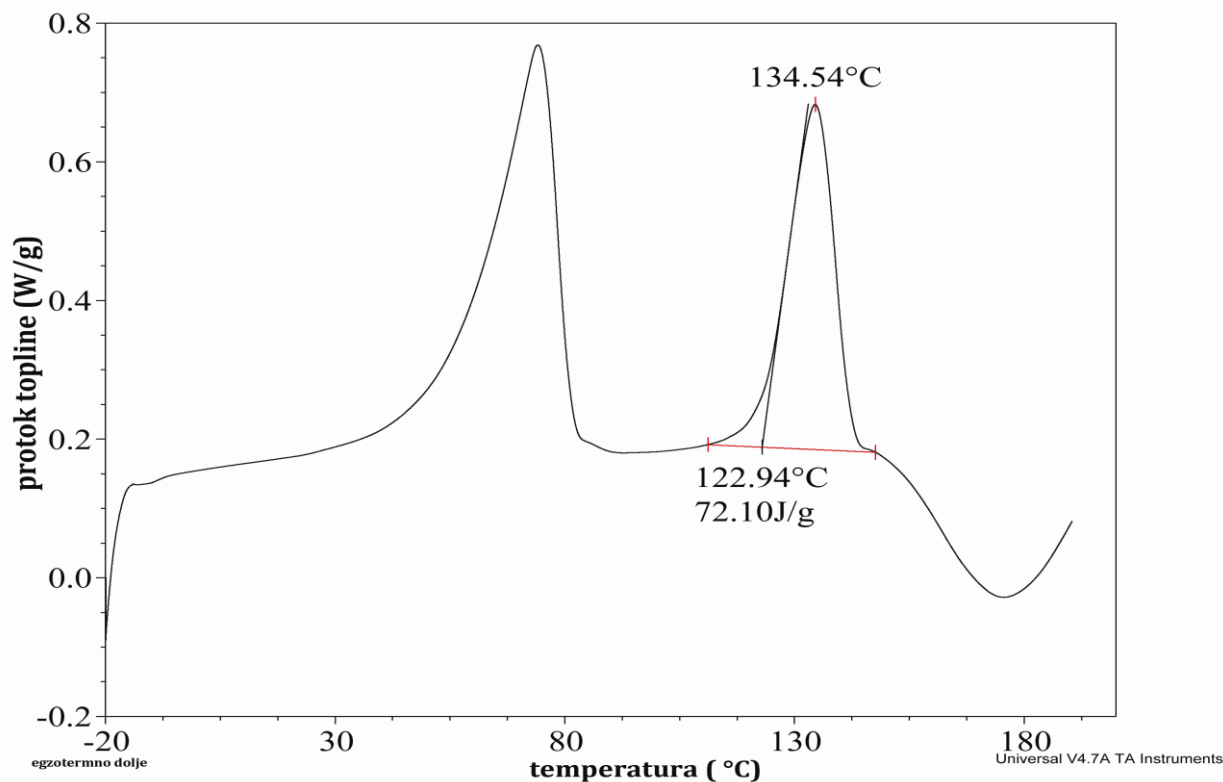
**Slika 5 – 3.** Difraktogrami mikročestica s različitim omjerom lijeka i polimera [I (1 : 5), II (1 : 2), III (1 : 1), IV (1 : 2) i V (5 : 1) (*m/m*)], te amornog lijeka i polimera dobivenih sušenjem raspršivanjem (SR)

### 5.1.5. Termička svojstva mikročestica

S obzirom na amornost mikročestica, ispitana su njihova termička svojstva. Primijenjena je modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija (MDSC) kako bi se razlučila termička svojstva povezana s promjenom toplinskog kapaciteta (u točki staklastog prijelaza,  $T_g$ ) od drugih preklapajućih događaja vidljivih u krivulji ukupnog protoka topline (Craig i sur., 1999; Hill i sur., 1999). Termičke analize binarnih smjesa (lijeka i polimera) omogućuju analizu mješivosti lijeka i polimera, uz uporabu dobro poznate GT jednadžbe.

Odstupanja od predviđene GT vrijednosti staklišta upućuju na postojanje nesavršenosti u miješanju komponenti kao što su razdvajanje faza ili specifične interakcije lijeka i polimera (Hancock i Zografi, 1997; Wiranidchapon i sur., 2008). Termogram kristalnog lijeka ima endotermni prijelaz na  $\sim 134^\circ\text{C}$ , koji odgovara talištu ( $T_m$ ) (sl. 5 – 4).





**Slika 5 – 4.** Termogram (ukupnog protoka topline) mupirocin kalcij dihidrata

Amorfni lijek pripremljen sušenjem raspršivanjem imao je staklište na temperaturi  $59,1 \pm 0,5$  °C. Temperatura staklišta odčitana je na krivulji reverzibilnog protoka topline jer se na krivulji ukupnog protoka topline staklište preklapalo s desolvacijskim endotermnim prijelazom. Nakon primjene ciklusa zagrijavanja, hlađenja i ponovnog zagrijavanja uočeno je da se staklište pomaknulo na  $77,8 \pm 0,3$  °C što upućuje na plastifikacijski učinak ostatnog otapala (u ovom slučaju metanola  $\sim 1,4\%$ ) na amorfni oblik lijeka (sušenog raspršivanjem). Promjena toplinskog kapaciteta ( $\Delta C_p$ ) u točki staklišta za amorfni mupirocin kalcij bila je  $0,411 \pm 0,061$  J/(g °C). Dodatno, analizom polimera (Eudragita RS) utvrđeno je da je njegovo staklište na temperaturi  $56,3 \pm 0,5$  °C (Dillen i sur., 2006; Sipos i sur., 2008), s promjenom toplinskog kapaciteta  $0,156 \pm 0,035$  J/(g °C). Ostatni metanol ( $\sim 0,9\%$ ) nije imao utjecaja na staklište polimera, što je potvrđeno cikličnim zagrijavanjem uzorka ( $T_g = 56,8 \pm 0,0$  °C).

**Tablica 5 – 3.** Svojstva mikročestica s različitim omjerima lijeka i polimera (*m/m*) sušenih raspršivanjem na 100 °C

<b>Mikročestice (lijeak : polimer, <i>m/m</i>)</b>	<b>T<sub>g</sub> [°C ± SD]</b>	<b>T<sub>g</sub>' [°C ± SD]</b>	<b>GT [°C]</b>	<b>Ostatna otapala [% ± SD]</b>
I (1 : 5)	60,7 ± 2,6	59,0 ± 0,4	~59,5	0,94 ± 0,01
II (1 : 2)	66,9 ± 1,3	78,8 ± 1,4	~62,4	0,80 ± 0,01
III (1 : 1)	66,7 ± 1,4	78,3 ± 0,1	~65,7	0,98 ± 0,03
IV (2 : 1)	65,5 ± 1,3	76,8 ± 0,4	~69,3	1,24 ± 0,05
V (5 : 1)	66,3 ± 0,8	77,3 ± 0,6	~73,3	1,32 ± 0,09

Legenda:

SD – standardna devijacija (n=3); T<sub>g</sub> – temperatura staklišta; T<sub>g</sub>' – temperatura staklišta nakon ciklusa zagrijavanja – hlađenja – zagrijavanja; GT – temperatura staklišta za smjese lijeka i polimera izračunana prema Gordon-Taylorovoj jednadžbi

Sve termograme mikročestica karakterizira izostanak „pika“ taljenja lijeka na temperaturi od približno 133 °C, što pokazuje da je lijek unutar mikročestica amorfan. To dodatno potvrđuje rezultate analiza rendgenske difrakcije opisane u prethodnom odjeljku (sl. 5 – 3). Za sve omjere lijeka i polimera detektiran je samo jedan staklasti prijelaz koji ukazuje da su formirane čvrste disperzije lijeka i polimera uz potpunu mješivost na molekulskoj razini. Iz termograma ukupnog protoka topline također je vidljivo da mikročestice sadržavaju određenu količinu ostatnog otapala, koje daje širok endotermni prijelaz u rasponu temperatura od 30 do 100 °C, a kojega na krivulji reverzibilnog protoka topline nema. Dodatno su provedene termogravimetrijske analize čiji su rezultati prikazani u tablici 5 – 3.

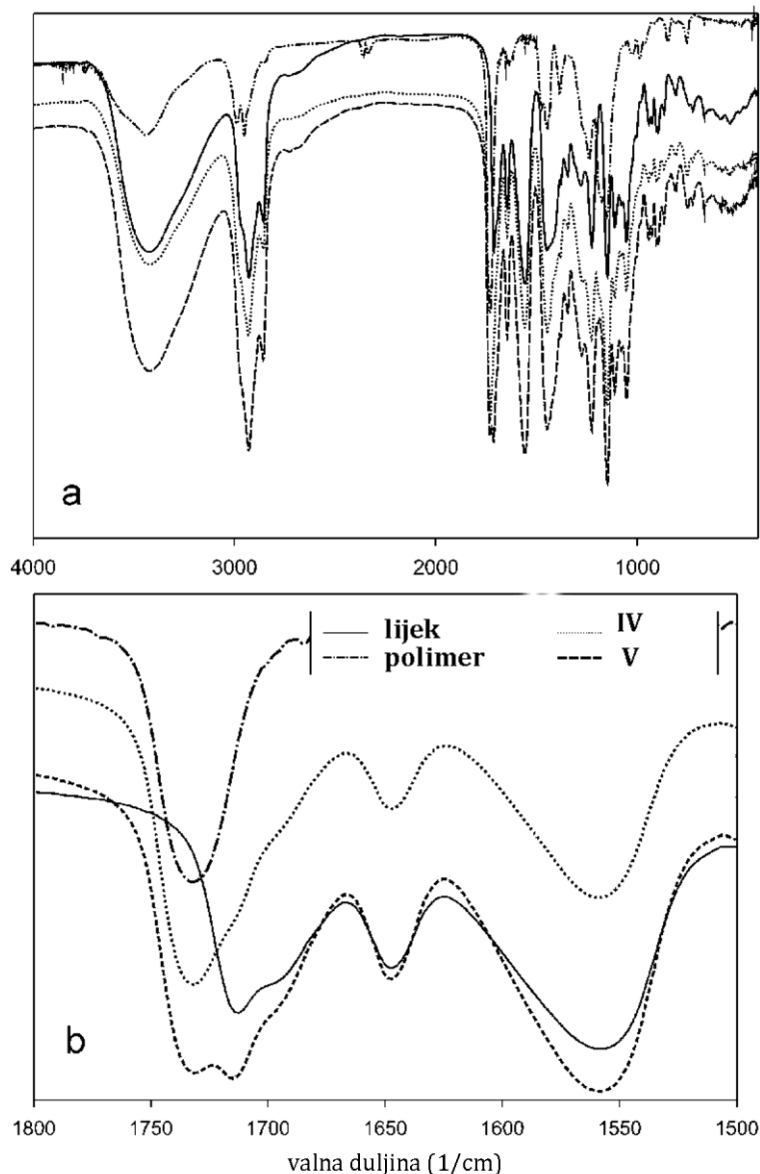
Mikročestice s većim udjelom lijeka (IV i V) imale su veći sadržaj ostatnih otapala nego druge mikročestice. Odčitane i predviđene temperatura staklišta prema GT jednadžbi nije bilo moguće uspoređivati zbog ostatnog otapala, potencijalnog plastifikatora sustava.

Stoga su provedene termičke analize s cikličnim zagrijavanjem, koje su omogućile uklanjanje ostatnog otapala i analizu stvarnog staklišta (T<sub>g</sub>', tabl. 5 – 3). Ostatno otapalo nije imalo nikakvog utjecaja na mikročestice I s najmanjim udjelom lijeka. Temperatura staklastog prijelaza (59,0±0,4 °C) tih mikročestica dobro je odgovarala GT predikciji

(59,5 °C) (uz pretpostavku o jednakim gustoćama lijeka i polimera). Dodatno,  $T_g'$  vrijednosti za ostale mikročestice bile su više od onih predviđenih GT jednadžbom (GT, tabl. 5 – 3). Međutim, MDSC analize fizičkih smjesa polimera i lijeka u navedenim omjerima pokazale su da porast  $T_g$  vrijednosti nije stvaran te da je uzrokovan razdvajanjem faza zbog cikličnog zagrijavanja. I takva termička analiza, nažalost, nije omogućila usporedbu stvarne temperature staklišta (bez utjecaja ostatnog otapala) i one predviđene GT jednadžbom sa svrhom otkrivanja interakcija između lijeka i polimera ili faznih separacija.

#### ***5.1.6. FTIR i FT Ramanova spektroskopija mikročestica***

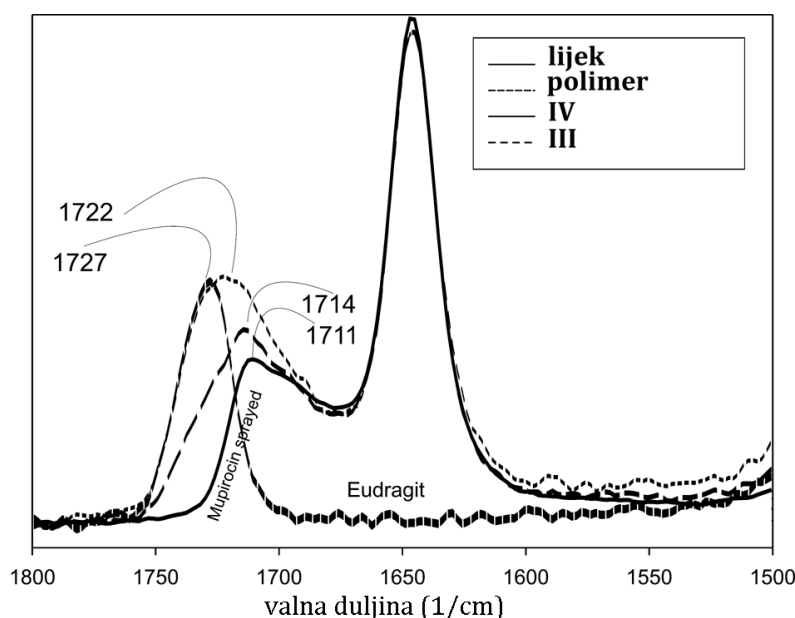
Za dodatnu analizu mješivosti lijeka i polimera provedene su spektroskopske analize (FTIR i FT Raman). Spektri mikročestica uspoređeni su sa spektrima lijeka i polimera pripremljenima na jednak način, tj. sušenjem raspršivanjem. FTIR spektri mikročestica odgovarali su fizičkim smjesama lijeka i polimera u zadnim omjerima. Međutim, u području karbonilnih istezanja od 1 700 do 1 750  $\text{cm}^{-1}$ , pripisanih esterskim skupinama lijeka i polimera, primijećena je razlika u obliku i poziciji vrpce između mikročestica i fizičkih smjesa lijeka i polimera. Istezanje karbonilne skupine na 1 713  $\text{cm}^{-1}$  u spektru amorfne lijeka pomaknuto je prema nižim valnim duljinama u spektru mikročestica IV (vrpca u obliku ramena na 1 695  $\text{cm}^{-1}$ ) (sl. 5 – 5).



**Slika 5 – 5.** a) FTIR spektri lijeka (sušenog raspršivanjem), polimera (sušenog raspšivanjem) i mikročestica s različitim omjerima lijeka i polimera: IV (2 : 1,  $m/m$ ) i V (5 : 1,  $m/m$ ); b) detaljni prikaz FTIR spektara u području između 1 500 i 1 800  $\text{cm}^{-1}$

Ramanovi su spektri pokazali još veće razlike u položaju vrpce u područjima C=O istezanja dajući komplementarne rezultate FTIR analizama (sl. 5 – 6). Istezanje C=O skupina lijeka bilo je na 1 711  $\text{cm}^{-1}$ , a polimera na 1 727  $\text{cm}^{-1}$ . Spektri mikročestica IV imali su samo jednu vrpcu na 1 722  $\text{cm}^{-1}$ . Ta je vrpca bila pomaknuta prema višim valnim duljinama s

obzirom na lijek, a prema nižim s obzirom na polimer. Ramanovi spektri mikročestica III imali su C=O vrpcu na  $1\,714\text{ cm}^{-1}$ , koja je također bila pomaknuta prema višim valnim duljinama s obzirom na lijek. Evidentno je postojala drugačija molekulska okolina lijeka unutar mikročestica, što ukazuje na interakciju lijeka i polimera unutar čvrste disperzije mikročestica. S obzirom na pomicanje C=O istezanja prema višim valnim duljinama, možemo zaključiti da su između lijeka i polimera postojale slabije vodikove veze nego između samih molekula lijeka. Ta zapažanja također pokazuju da je lijek fino dispergiran unutar polimernog matriksa za mikročestice III i IV.



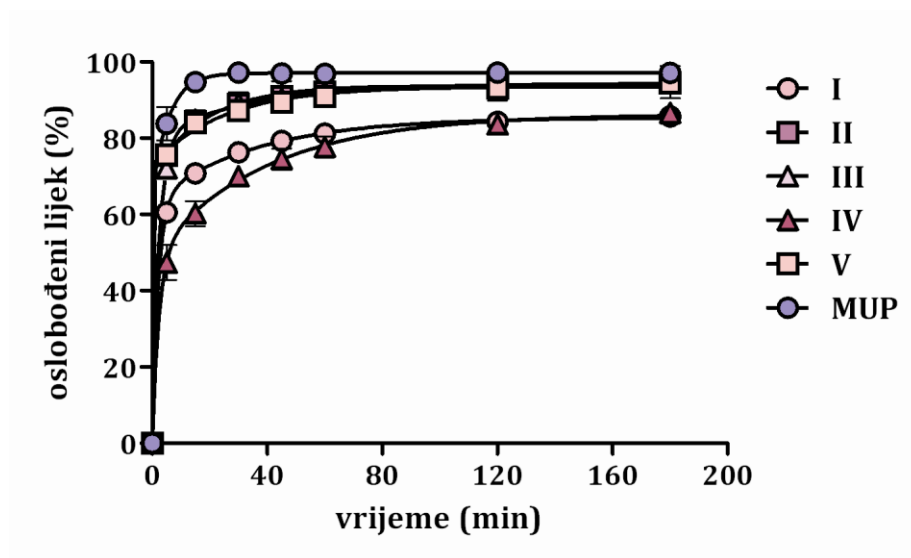
**Slika 5 – 6.** Ramanovi spektri lijeka (sušenog raspršivanjem), polimera (sušenog raspršivanjem) i mikročestica s različitim omjerima lijeka i polimera: III (1 : 1,  $m/m$ ) i IV (2 : 1,  $m/m$ )

Nasuprot tome, za mikročestice V, s najvećim udjelom lijeka s obzirom na polimer, C=O istezanje u FTIR spektru (sl. 5 – 5) bilo je „razdijeljeno“ na dvije vrpce, na  $1\,732\text{ cm}^{-1}$  i  $1\,714\text{ cm}^{-1}$ . Pojava dviju vrpce upućuje na postojanje razdvojenih amorfnih faza lijeka i polimera. Iako su MDSC mjerenja pokazala samo jedno staklište, svojstveno potpuno izmiješanim fazama, FTIR mjerenja u ovom su slučaju bila osjetljivija na razdvajanje faza. Metodologija MDSC vjerojatno je bila nedovoljno selektivna za dva vrlo bliska termička

događaja. Janssens i sur. (2008a) također su dokazali razdvojene faze primjenom rendgenske fotoelektronske spektroskopije iako su MDSC analize pokazivale jedno staklište.

### 5.1.7. In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica

Na slici 5 – 7. prikazani su profili oslobađanja lijeka iz mikročestica s različitim omjerima lijeka i polimera. Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka provedeno je primjenom monoeksponencijalnih i bieksponencijalnih jednadžbi te je njihova prikladnost provjerena uz pomoć F-testa sume kvadrata (tabl. 5 – 4). Bieksponencijalni modeli pokazali su najbolje slaganje sa stvarnim rezultatima oslobađanja lijeka iz mikročestica za sve analizirane uzorke, upućujući na dvije zasebne faze oslobađanja lijeka (brzu,  $k_1$  i usporenu,  $k_2$ ). Dodatno, osim usporedbe modela uz pomoć statističkih testova, bilo je evidentno da su koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) bieksponencijalnih modela za svaki pojedinačni uzorak bili veći od koeficijenata determinacije ( $R^2$ ) monoeksponencijalnih modela.



**Slika 5 – 7.** In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica s različitim omjerom lijeka i polimera [I (1 : 5), II (1 : 2), III (1 : 1), IV (1 : 2) i V (5 : 1) ( $m/m$ )] u usporedbi sa samim lijekom

**Tablica 5 – 4.** Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka iz mikročestica s različitim omjerom lijeka i polimera [I (1 : 5), II (1 : 2), III (1 : 1), IV (1 : 2) i V (5 : 1) (*m/m*)] sušenih raspršivanjem na 100 °C

Mikročestice	Monoeksponencijalni model $Q = a(1 - e^{-kt})$			Bieksponencijalni model $Q = A(1 - e^{-k_1t}) + B(1 - e^{-k_2t})$				
	R <sup>2</sup>	a	k	R <sup>2</sup>	A	k <sub>1</sub>	B	k <sub>2</sub>
		[% ± SEM]	[min <sup>-1</sup> ± SEM]		[% ± SEM]	[min <sup>-1</sup> ± SEM]	[% ± SEM]	[min <sup>-1</sup> ± SEM]
I <sup>(B)</sup>	0,977	80,1 ± 1,3	0,265 ± 0,033	1,000	63,5 ± 1,7	0,479 ± 0,044	22,0 ± 2,5	0,028 ± 0,004
II <sup>(B)</sup>	0,990	88,7 ± 0,9	0,337 ± 0,030	1,000	76,1 ± 1,8	0,521 ± 0,045	16,1 ± 2,5	0,033 ± 0,005
III <sup>(B)</sup>	0,990	85,4 ± 0,9	0,293 ± 0,024	0,998	64,2 ± 11,9	0,556 ± 0,229	23,2 ± 13,0	0,064 ± 0,024
IV <sup>(B)</sup>	0,943	78,8 ± 3,3	0,134 ± 0,028	0,994	50,6 ± 3,6	0,376 ± 0,063	35,6 ± 5,3	0,025 ± 0,005
V <sup>(B)</sup>	0,992	90,0 ± 0,8	0,349 ± 0,019	1,000	79,2 ± 0,7	0,503 ± 0,016	14,2 ± 1,0	0,030 ± 0,002

Legenda:

Q – postotak lijeka oslobođen u vremenu t; a – „plato“ vrijednost; k, k<sub>1</sub> i k<sub>2</sub> – konstante brzina; SEM – standardna pogreška; A i B – parametri koji predložuju udio lijeka oslobođenoga u brzom i usporenoj fazi oslobađanja lijeka; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; <sup>(M),(B)</sup> – monoeksponencijalni ili bieksponencijalni model preferirani su matematički model (nakon usporedbe modela F-testom sume kvadrata)

Svi profili oslobađanja lijeka pokazuju brzo početno oslobađanje lijeka (parametar A, tabl. 5 – 4) koje se kreće između  $50,6 \pm 3,6\%$  (mikročestice IV) i  $79,2 \pm 0,7\%$  (mikročestice V) uklopljenog lijeka. Slični, vrlo visoki rezultati oslobađanja lijeka već su objavljeni za mikročestice s Eudragit® RS polimerom i uklopljenim diltiazemom (Kristmundsdóttir i sur., 1996), tolmetinom (Pignatello i sur., 1997) i salbutamolom (Chen i sur., 2008).

Najsporije oslobađanje lijeka neočekivano je ostvareno za mikročestice IV, koje sadržavaju dva puta više lijeka od polimera. Početno oslobođena količina lijeka bila je  $\sim 50\%$ , a ni nakon tri sata lijek nije bio u potpunosti oslobođen ( $86,7 \pm 1,5\%$ ). Konstanta brzine brze faze ( $k_1$ ) oslobađanja lijeka iznosila je  $0,376 \pm 0,063 \text{ min}^{-1}$  i bila je najniža ostvarena vrijednost među svim mikročesticama. Dodatno, uzorak s najvećim udjelom polimera (mikročestice I) pokazao je niže početno oslobađanje lijeka (parametar A =  $63,5 \pm 1,7\%$ ), dok je nakon tri sata dosegnuta vrijednost od  $86,6 \pm 1,7\%$ , s konstantom brzine  $k_1$  od  $0,479 \pm 0,044 \text{ min}^{-1}$ . Početno oslobađanje lijeka iz drugih mikročestica bilo je ekstremno brzo i nije omogućivalo bilo kakvo značajno kontroliranje oslobađanja lijeka ( $k_1 > 0,503 \text{ min}^{-1}$ ).

Očekivalo se da će povećana količina polimera (mikročestice I) zbog vlastite netopljivosti uvjetovati usporeno oslobađanje lijeka (Al-Zoubi i sur., 2008), ali su rezultati pokazali da je početno oslobađanje lijeka bilo izuzetno visoko ( $\sim 64\%$ ). Analize čvrstog stanja mikročestica potvrdile su da je lijek u potpunosti dispergirao unutar polimernog matriksa. Konverzija lijeka iz kristalnog stanja u amorfno nije pogodovala željenim učincima sustava i pridonijela je pojavi visokoga početnog oslobađanja lijeka, nasuprot očekivanju da će netopljivi polimer koji okružuje lijek spriječiti takve pojave. Mogući razlozi za takvo oslobađanje lijeka jesu kinetika i način taloženja polimera. Bain i sur. (1999) te Yeo i Park (2004) naveli su da u uvjetima brzog uklanjanja otapala, naglo taloženje polimera rezultira niskom gustoćom polimera. Polimerni lanci nemaju dovoljno vremena za kontrolirano taloženje pa nastaju polimerni matriksi niže gustoće (bez obzira na vizualno kompaktne mikročestice bez vidljivih pora). Niska gustoća polimera omogućuje lakši ulazak vode te nesmetano oslobađanje lijeka. Naborana struktura mikročestica (mikročestice I) dodatno potkrepljuje hipotezu o brzom i nekontroliranom taloženju polimera.



Mikročestice s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) (mikročestice IV) pokazale su neočekivano najniže početno oslobađanje lijeka, kao i ukupni profil, koji ni nakon tri sata nije dosegnoo ukupnu količinu uklopljenog lijeka. To je značilo da je u tim eksperimentalnim uvjetima nastao polimerni matriks superiorniji od drugih. Mikročestice IV bile su amorfne bez vidljive kristalizacije lijeka. FTIR i FT Ramanove spektroskopske analize potvrdile su postojanje čvrste disperzije na molekulskoj razini (tj. čvrste otopine), bez odvojene amorfne faze lijeka. Nisu postojale ni interakcije između lijeka i polimera koje bi utjecale na snižavanje topljivosti lijeka. Analize veličine čestica i sama vizualna analiza (SEM) također su pokazale da su te mikročestice najmanje, što je bilo u suprotnosti s uočenim profilom oslobađanja. Međutim, vrlo glatka površina i izrazito pravilni oblici tih mikročestica upućuju na činjenicu da su one nastale vrlo polako i kasnije u procesu sušenja (Wang i Wang, 2002b). Stoga postoji vjerojatnost da je proces očvršćivanja mikročestica utjecao na obilježja oslobađanja lijeka.

Snizeni udio polimera u sastavu tih mikročestica snizio je početnu zasićenost polimera i odgodio njegovo taloženje (nastanak matriksa) za kasniji trenutak u procesu sušenja, omogućujući bolje konformiranje polimernih lanaca. Kako bi se ispitala ta hipoteza, provedena su dodatna istraživanja načina stvaranja polimernog matriksa variranjem ulazne temperature i koncentracije otopine za raspršivanje. Rezultati istraživanja opisani su u idućim poglavljima.

## **5.2. Utjecaj ulazne temperature na svojstva mikročestica**

Ulazna temperatura zraka ili inertnog plina za sušenje smatra se jednim od vrlo bitnih procesnih parametara u procesu sušenja raspršivanjem. Temperatura izravno utječe na dinamiku ispravanja otapala, što u konačnici određuje brzinu povlačenja površine kapljice te uvelike utječe na morfologiju novonastalih mikročestica (Vehring i sur., 2007). Kad se tijekom procesa sušenja raspršivanjem primjenjuju više ulazne temperature, brže se stvara čvrsti vanjski sloj na površini mikročestice, što znatno skraćuje vrijeme sušenja. To podvrgava površinu mikročestice višim temperaturama nego kad se sušenje provodi na nižim ulaznim temperaturama (Masters, 1985).

### **5.2.1. Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka**

Mikročestice s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) iz prethodnog poglavlja podvrgnute su sušenju na različitim ulaznim temperaturama, u rasponu od 70 do 110 °C, navedenima u tablici 5 – 5.

**Tablica 5 – 5.** Ulazne i izlazne temperature za mikročestice s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) sušene raspršivanjem na različitim temperaturama

<b>Mikročestice</b>	<b>Ulazna temperatura [°C]</b>	<b>Izlazna temperatura [°C]</b>
IV-110	110	70 – 60
IV-100	100	65 – 53
IV-90	90	56 – 46
IV-80	80	47 – 41
IV-70	70	41 – 37

Uklapanje lijeka bilo je vrlo uspješno za sve pripremljene mikročestice i kretalo se između 99,0 i 101,7% (tabl. 5 – 6). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem za sve je ulazne temperature bilo veće od 55% (tabl. 5 – 6). Takva se iskorištenja smatraju uspješnima za procese sušenja raspršivanjem na laboratorijskom uređajima, koji su često povezani s vrlo niskim iskorištenjem (Al-Zoubi i sur., 2008). Esposito i sur. (2000) objavili su da je povećanje ulazne temperature bilo povezano sa sniženjem iskorištenja procesa, ali

takvi rezultati nisu dobiveni u našim istraživanjima. Nasuprot njima, Maury i sur. (2005) pokazali su da povećanje temperature procesa pogoduje iskorištenju sve dok izlazne temperature ne prijeđu staklište sušenog materijala.

**Tablica 5 – 6.** Svojstva mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem na različitim temperaturama

Mikročestice	Iskorištenje procesa [%]	Sadržaj lijeka u mikročesticama [% ± SD]	Uspješnost uklapanja lijeka [% ± SD]
IV-110	53,7	64,1 ± 0,3	101,7 ± 0,4
IV-100	57,2	63,7 ± 1,4	101,1 ± 2,3
IV-90	59,4	63,6 ± 0,0	100,9 ± 0,4
IV-80	55,9	62,4 ± 0,1	99,0 ± 0,1
IV-70	57,1	63,5 ± 0,3	100,8 ± 0,5

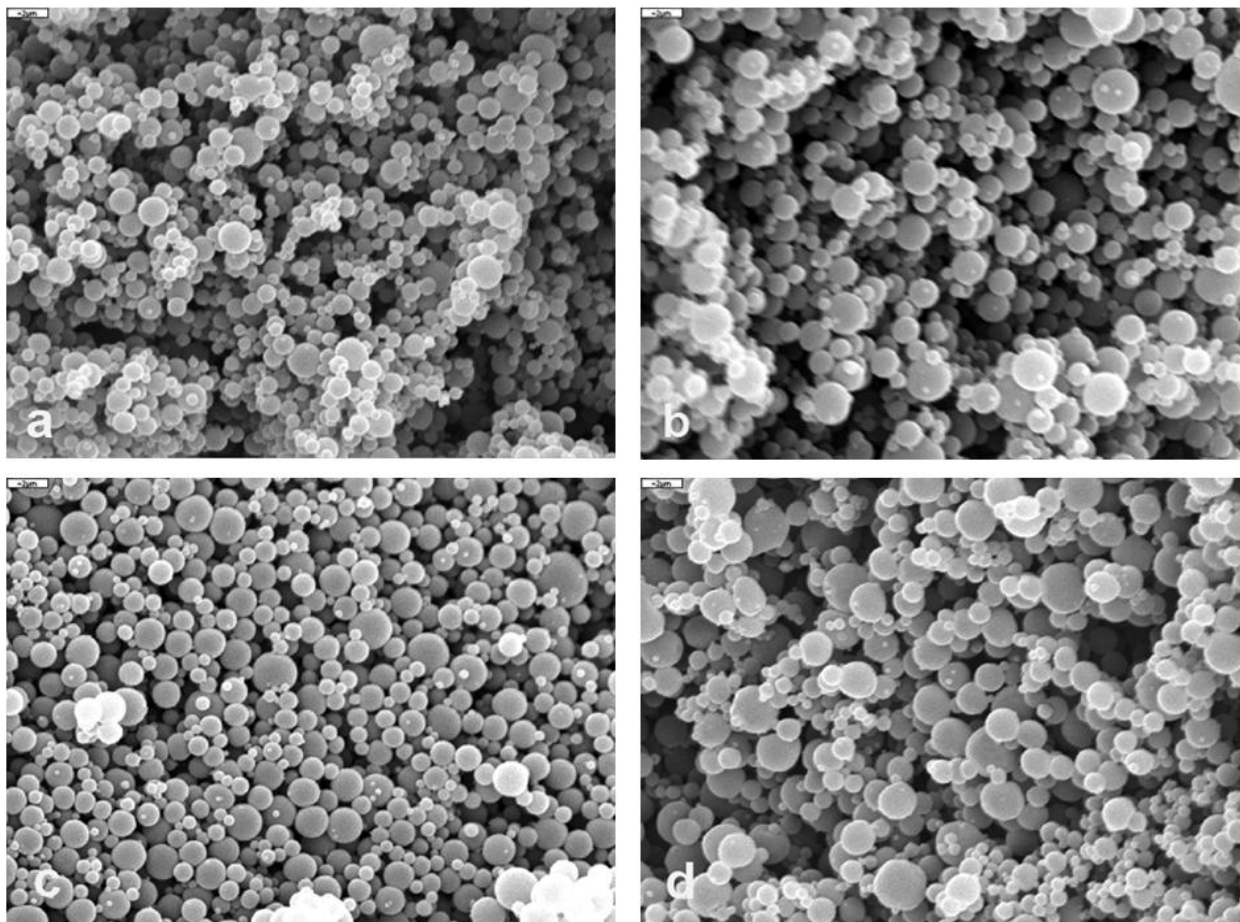
Legenda:

iskorištenje procesa (%) – omjer mase dobivenih mikročestica i mase ukupnih sastojaka dodanih u otopinu za raspršivanje; uspješnost uklapanja lijeka (% *m/m*) – omjer stvarnoga i teoretskog (dodanog) sadržaja mupirocin kalcija u mikročesticama; SD – standardna devijacija (n=3)

### 5.2.2. Morfologija mikročestica

Slika 5 – 8. prikazuje snimke mikročestica sušenih na različitim ulaznim temperaturama, napravljene uz pomoć pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM). Primjećuje se da su sve mikročestice pravilnih sferičnih oblika. Površine su im glatke, bez vidljivih pora ili deformacija.

Promjena ulazne temperature i posljedična promjena brzine ispravanja u ovom slučaju nisu imali znatan utjecaj na morfologiju mikročestica, tj. na njihov vanjski izgled.



**Slika 5 – 8.** SEM slike mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem na različitim ulaznim temperaturama: a) na 110 °C; b) na 90 °C; c) na 80 °C i d) na 70 °C

### **5.2.3. Veličina čestica**

Volumna raspodjela veličine čestica prikazana je u tablici 5 – 7. Vidljivo je da su čestice vrlo sličnih dimenzija iako postoje razlike u parametru  $d(0,9)$ . Razlike u tom parametru volumne distribucije pripisuju se malom broju većih čestica ili aglomerata čija je incidencija u raspodjeli vrlo rijetka, ali je njihov volumni doprinos ukupnom volumenu velik. Ako se rezultati volumne raspodjele usporede sa SEM slikama, vidljivo je da i tada postoji nesuglasje između veličina mikročestica određenih tim komplementarnim metodama. Prema SEM slikama, sitnije čestice nastaju pri višim ulaznim temperaturama, što pri tumačenju volumnih raspodjela nije vidljivo. Stoga mnogi autori predlažu da se analitički rezultati distribucije veličine čestica dobivenih metodom difrakcije laserskog zračenja usporede sa SEM slikama.

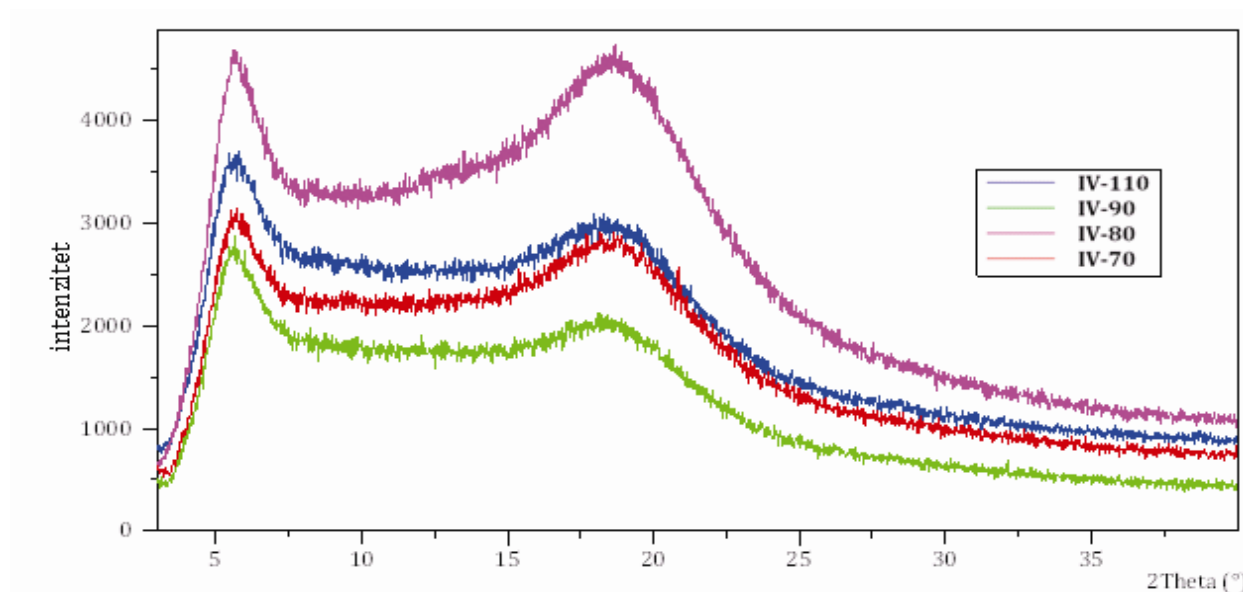
**Tablica 5 – 7.** Volumna raspodjela veličine čestica uzoraka s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem na ulaznim temperaturama 110, 100, 90, 80 i 70 °C

Mikročestice	Raspodjela veličine čestica [ $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ]		
	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
IV-110	1,2 $\pm$ 0,0	3,1 $\pm$ 0,0	10,1 $\pm$ 0,2
IV-100	1,2 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,0	10,6 $\pm$ 0,2
IV-90	0,8 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,0	9,6 $\pm$ 0,2
IV-80	0,8 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 0,2
IV-70	0,8 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,1

Legenda: d(0,1), d(0,5) i d(0,9) označavaju da je 10, 50 i 90% volumne raspodjele mikročestica ispod navedene vrijednosti; SD – standardna devijacija (n=6)

#### **5.2.4. Rendgenska difrakcija mikročestica**

Difraktogrami mikročestica pripremljenih na različitim ulaznim temperaturama prikazani su na slici 5 – 9. Vidljivo je da na njemu nema „pikova“ koji bi odgovarali kristalnom lijeku te da je tijekom procesuiranja otopine za sušenje došlo do potpune amorfizacije lijeka. Kako je u prethodnom poglavlju opisano, zbog iznimno brzog taloženja mikročestica i dobre topljivosti lijeka u metanolu, kristalizacija lijeka je onemogućena. Halo difraktogrami svih mikročestica međusobno su slični zbog identičnog sastava (udjela lijeka i polimera).



**Slika 5 – 9.** Difraktogrami mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem na ulaznim temperaturama 110, 90, 80 i 70 °C

### 5.2.5. Termička svojstva mikročestica

Termička svojstva mikročestica prikazana su u tablici 5 – 8. Na termogramima reverzibilnog protoka topline postojao je samo jedan staklasti prijelaz za sve mikročestice, što upućuje na činjenicu da je ostvarena potpuna mješivost lijeka i polimera u 2 : 1 ( $m/m$ ) omjeru. Temperature staklastog prijelaza pokazivale su određeni trend tj. tendenciju pada temperature staklišta sa sniženjem ulazne temperature sušenja. Primjenom jednosmjerne analize varijance pokazalo se da ne postoji statistička razlika između navedenih uzoraka ( $P > 0,05$ ). Međutim, pojedinačnim usporedbama staklišta mikročestica IV-110 i IV-70 pokazalo se da između tih vrijednosti ipak postoji statistički značajna razlika ( $P < 0,05$ ).

Uzorci sušeni na višim temperaturama imali su smanjen udio ostatnih otapala pa je tako udio padao od ~1,4 do ~1,1%, kad je temperatura sušenja rasla od 70 do 110 °C. Također je vidljivo da su povećani udjeli ostatnih otapala povezani sa sniženim temperaturama staklišta. Takva pojava može biti posljedica plastifikacijskog utjecaja otapala na mikročestice.

**Tablica 5 – 8.** Svojstva mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem na ulaznim temperaturama 110, 100, 90, 80 i 70 °C

Mikročestice	T <sub>g</sub> [°C ± SD]	Ostatna otapala [% ± SD]
IV-110	67,2 ± 1,9*	1,12 ± 0,09
IV-100	65,5 ± 1,3	1,24 ± 0,05
IV-90	62,9 ± 2,4	1,32 ± 0,03
IV-80	62,8 ± 2,4	1,33 ± 0,08
IV-70	59,7 ± 3,6*	1,44 ± 0,08

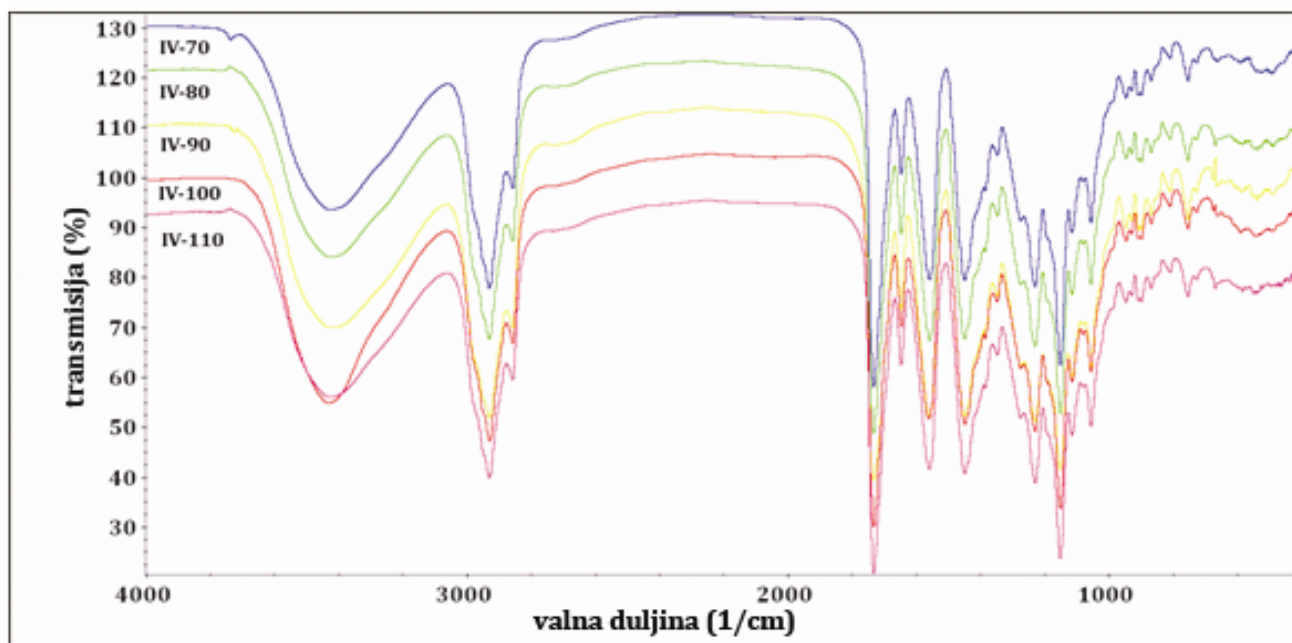
Legenda:

SD – standardna devijacija (n=3); T<sub>g</sub> – temperatura staklišta; \* – statistički značajna razlika (*P*<0,05)

### 5.2.6. FTIR spektroskopija mikročestica

FTIR spektri mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem pri različitim temperaturama (sl. 5 - 10) pokazuju da među mikročesticama nema znatne razlike u poziciji IR vrpce. Međusobno miješanje polimera i lijeka nije bilo uvjetovano promjenom temperature.

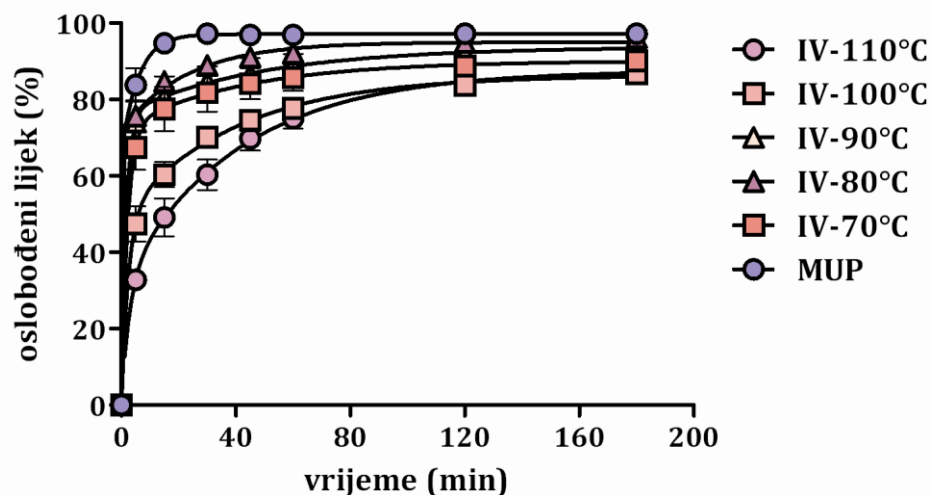




**Slika 5 – 10.** FTIR spektri mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem na ulaznim temperaturama 70, 80, 90, 100 i 110 °C

### **5.2.7. In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica**

Na slici 5 – 11 prikazani su profili oslobađanja lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem na različitim ulaznim temperaturama. Matematičko modeliranje profila oslobađanja lijeka prikazano je u tablici 5 – 9. Bieksponencijalne su jednadžbe u odnosu prema monoeksponencijalnim jednadžbama potvrđene kao matematički model koji najbolje opisuje oslobađanje lijeka iz svih uzoraka.



**Slika 5 – 11.** *In vitro* oslobađanje lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem na ulaznim temperaturama 110, 100, 90, 80 i 70 °C

Opet je vidljivo da je početno oslobađanje lijeka znatno sniženo ( $P < 0,05$ ), s  $50,6 \pm 3,6\%$  (parametar A, mikročestice IV-100) na  $32,1 \pm 2,9\%$  (parametar A, mikročestice IV-110), kad je ulazna tempertura porasla sa 100 na 110 °C. Također je vidljivo da pri nižim temperaturama sušenja, tj. pri 90, 80 i 70 °C redom dolazi do naglog porasta početnog oslobađanja lijeka, i to na  $76,1 \pm 0,5$ ,  $78,6 \pm 1,0$  i  $72,4 \pm 0,7\%$ .

**Tablica 5 – 9.** Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka iz mikročestica sušenih na ulaznim temperaturama 110, 100, 90, 80 i 70 °C s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*)

Mikročestice	Monoeksponecijalni model $Q = a(1 - e^{-kt})$			Bieksponecijalni model $Q = A(1 - e^{-k_1t}) + B(1 - e^{-k_2t})$				
	R <sup>2</sup>	a [% ± SEM]	k [min <sup>-1</sup> ± SEM]	R <sup>2</sup>	A [% ± SEM]	k <sub>1</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]	B [% ± SEM]	k <sub>2</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]
IV-110 <sup>(B)</sup>	0,962	82,7 ± 4,4	0,047 ± 0,011	0,999	32,1 ± 2,9	0,346 ± 0,061	55,5 ± 4,2	0,024 ± 0,002
IV-100 <sup>(B)</sup>	0,943	78,8 ± 3,3	0,134 ± 0,028	0,994	50,6 ± 3,6	0,376 ± 0,063	35,6 ± 5,3	0,025 ± 0,005
IV-90 <sup>(B)</sup>	0,984	87,9 ± 1,9	0,362 ± 0,070	1,000	76,1 ± 0,5	0,599 ± 0,031	17,6 ± 1,0	0,021 ± 0,002
IV-80 <sup>(B)</sup>	0,989	91,0 ± 1,7	0,324 ± 0,049	0,999	78,6 ± 1,0	0,483 ± 0,025	16,8 ± 1,6	0,027 ± 0,003
IV-70 <sup>(B)</sup>	0,985	85,0 ± 1,8	0,305 ± 0,051	0,999	72,4 ± 0,7	0,466 ± 0,018	17,7 ± 1,1	0,024 ± 0,002

Legenda:

Q – postotak lijeka oslobođen u vremenu t; a – „plato“ vrijednost; k, k<sub>1</sub> i k<sub>2</sub> – konstante brzina; SEM – standardna pogreška; A i B – parametri koji predložuju udio lijeka oslobođenoga u brzom i usporenoj fazi oslobađanja lijeka; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; <sup>(M),(B)</sup> – monoeksponecijalni ili bieksponecijalni model preferirani su matematički model (nakon usporedbe modela F-testom sume kvadrata)

Rezultati sugeriraju da ulazna temperatura sušenja bitno utječe na početno oslobađanje lijeka (ali i na ukupni profil); i to da viša ulazna temperatura pogoduje sniženju početnog oslobađanja lijeka. Kao što je već navedeno, postojao je određeni trend u temperaturama staklišta, koji je zahtijevao dubinsku analizu procesa sušenja. Podrobnije je razmotren utjecaj temperature na mikročestice tijekom njihova boravka u cilindru uređaja za sušenje. Viša ulazna temperatura (mnogo viša od vrelišta otapala) prouzročila je vrlo brzo isparavanje otapala i pogodovala vrlo ranom očvršćivanju mikročestica. „Život“ mikrokapljica pri takvim se uvjetima znatno skratio. Uz identične postavke aspiratora, mikročestice osušene na višim temperaturama egzistirale su dulje vrijeme u toplijoj unutrašnjosti cilindra. Temperatura je mogla utjecati na svojstva polimernog matriksa omogućujući bolju gibljivost polimernih lanaca iznad temperature staklišta. Za amorfne materijale, bolja gibljivost molekula ili polimernih lanaca omogućuje relaksacijske procese koji dovode do smanjenja slobodnog volumena i povećanja gustoće (Craig i sur., 1999). Pretpostavlja se da su takvi uvjeti omogućiti nužne konfiguracijske promjene koje su dovele do povećanja gustoće polimernog matriksa (Azarmi i sur., 2002). Dodatno, snižene vrijednosti ostatnih otapala za te mikročestice (IV-110 i IV-100) umanjile su plastifikacijski učinak samog otapala. Takvi su matriksi karakterizirani povećanim intermolekulskim silama uzduž polimernih lanaca koji mogu stvarati gušće matrikse. Svi ti procesi mogu ometati ulazak medija u mikročesticu te usporiti oslobađanje lijeka. Slična opažanja sniženja profila oslobađanja s porastom temperature sušenja zbog povećanja gustoće matriksa opisali su Fu i sur. (2001) za mikročestice izrađene od kopolimera mliječne i glikolne kiseline.

Suprotno prethodnim primjerima, uzorci sušeni na temperaturama nižima od 100 °C (točnije, 90, 80 i 70 °C) nisu egzistirali u gumastom stanju i postali su staklasti ranije u procesu sušenja. Izlazne temperature sušenja (tabl. 5 – 5) pokazuju da su mikročestice zapravo tijekom cijelog procesa sušenja bile u staklastom obliku, što je omelo molekulsko preslagivanje i zgušnjavanje matriksa iako je proces ispravanja bilo usporen. Takvi su zaključci u skladu s temperaturama staklišta odgovarajućih mikročestica iako se rezultati statistički značajno ne razlikuju. Duljina difuzijskog puta u mikročestičnim sustavima drastično je smanjena u usporedbi s makroskopskim terapijskim sustavima. Stoga je svaka devijacija u formiranju polimernog matriksa izvor povećanoga početnog oslobađanja lijeka

te i male promjene u temperaturi staklišta koje su povezane s gustoćom mikročestica (Bouissou i sur., 2006) valja pažljivo razmotriti.

### **5.3. Utjecaj koncentracije otopine za raspršivanje na svojstva mikročestica**

Koncentracija otopine za raspršivanje direktno utječe na sljedeće aspekte sušenja: a) na brzinu nastanka suhog produkta (početna zasićenost otopine određuje kinetiku formiranja mikročestica jer koncentriranije otopine brže postižu točku taloženja, istodobno sprečavajući da se vlažna kapljica stisne ili/i smanji, onemogućujući postizanje gušćih mikročestica) i b) na veličinu mikročestica (veća koncentracija otopljenе tvari može uvjetovati povećanje viskoznosti otopine koja u jednakim uvjetima raspršivanja (atomizacije) rezultira većim mikrokapljicama) (Rizi i sur.).

### **5.3.1. Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka**

Mikročestice s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) iz prethodnih poglavlja podvrgnute su sušenju pri konstantnoj ulaznoj temperaturi od 100 °C iz otopina različitih koncentracija (od 1 do 5%, *m/m*) opisanih u tablici 5 – 10.

**Tablica 5 – 10.** Koncentracija otopina za raspršivanje mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem pri konstantnoj temperaturi od 100 °C

<b>Mikročestice</b>	<b>Ukupna koncentracija lijeka i polimera [%, <i>m/m</i>]</b>	<b>Koncentracija lijeka u otopini [%, <i>m/m</i>]</b>
IV-1%	1%	0,67
IV-2%	2%	1,33
IV-3%	3%	2,00
IV-4%	4%	2,67
IV-5%	5%	3,33

Uklapanje lijeka bilo je vrlo uspješno za sve pripremljene mikročestice i kretalo se između 101,0 i 101,7% (tabl. 5 – 11). Primjećuje se da je iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem bilo niže za mikročestice pripremljene iz razrijeđenih otopina, tj. više za koncentriranije otopine (tabl. 5 – 11).

**Tablica 5 – 11.** Svojstva mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija (1, 2, 3, 4 i 5%, *m/m*)

Mikročestice	Iskorištenje procesa [%]	Sadržaj lijeka u mikročesticama [% ± SD]	Uspješnost uklapanja lijeka [% ± SD]
IV-1%	44,4	63,7 ± 0,0	101,2 ± 0,0
IV-2%	54,7	64,0 ± 0,3	101,7 ± 0,5
IV-3%	55,9	63,7 ± 1,4	101,1 ± 2,3
IV-4%	64,9	63,9 ± 0,5	101,5 ± 0,8
IV-5%	62,5	63,7 ± 0,5	101,0 ± 0,8

Legenda:

iskorištenje procesa (%) – omjer mase dobivenih mikročestica i mase ukupnih sastojaka dodanih u otopinu za raspršivanje; uspješnost uklapanja lijeka (% *m/m*) – omjer stvarnoga i teoretskog (dodanog) sadržaja mupirocin kalcija u mikročesticama; SD – standardna devijacija (n=3)

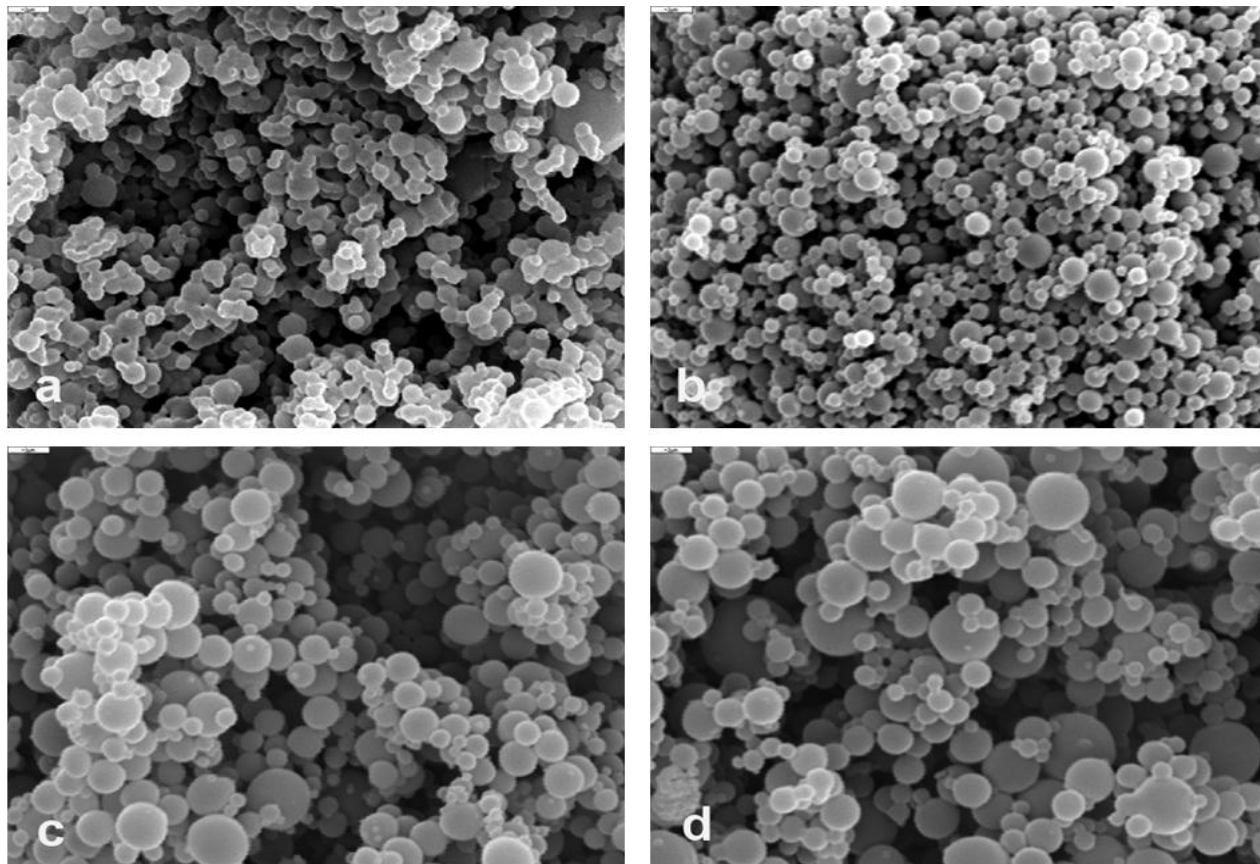
### 5.3.2. Morfologija mikročestica

Slika 5 – 12. prikazuje SEM slike mikročestica sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija (od 1 do 5%, *m/m*) pri stalnoj ulaznoj temperaturi. Slika 5 – 12. a) prikazuje deformirane i spojene (slijepljene) mikročestice. Ti su aglomerati nastali tijekom procesa sušenja mikrokapljica, najvjerojatnije zbog sudaranja mikročestica u cilindru. Pretpostavlja se da su fine kapljice zbog niskog sadržaja otopljenih tvari, a time i niske viskoznosti, imale neelastičnu („krhku“) površinu koja se zbog sudaranja lako deformirala. Slični su fenomeni mogli pogodovati lakšem odlaganju mikročestica na stijenkama cilindra, što je u konačnici rezultiralo smanjenim iskorištenjem procesa u usporedbi s drugim uzorcima (~44%, tabl. 5 - 6). Ostale mikročestice, dobivene iz 2-postotnih do 5-postotnih otopina, imale su pravilne sferične oblike (sl. 5 – 12. b – d). Vizualno veće mikročestice dobivene su iz koncentriranijih otopina iako su izmjerene vrijednosti volumne distribucije ujednačene (Elversson i Millqvist-Fureby, 2005a; Elversson i sur., 2003). Povećana koncentracija otopljene tvari u otopini za raspršivanje pogodovala je ranijem formiranju čvrste ljuske oko mikrokapljice, a ona je onemogućila naknadno povlačenje površine



mikrokapljice i smanjenje veličine mikročestice. Dodatno, količina otopljenih tvari (lijeka i polimera) povećala je viskoznost otopine, što je pridonijelo nastanku većih mikrokapljica.

Promjena koncentracije otopine nije pridonijela znatnoj promjeni morfologije mikročestica, osim za vrlo niske koncentracije (<2%).



**Slika 5 – 12 .** SEM slike mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija: a) 1%; b) 2%; c) 4% i d) 5%

### **5.3.3. Veličina čestica**

Volumna raspodjela veličine čestica prikazana je u tablici 5 – 12. Rezultati pokazuju postojanje aglomerata za uzorke mikročestica s najnižom koncentracijom tvari u otopini za sušenje (IV-1%), što je u skladu s prethodno opisanim morfološkim svojstvima. Ostale su mikročestice vrlo sličnih dimenzija, iako postoje razlike u  $d(0,9)$  parametru. Kao i prethodno, razlike u tom parametru volumne distribucije pripisuju se malom broju većih

čestica ili aglomerata čija je pojava u raspodjeli vrlo rijetka, ali je njihov volumni doprinos ukupnom volumenu velik.

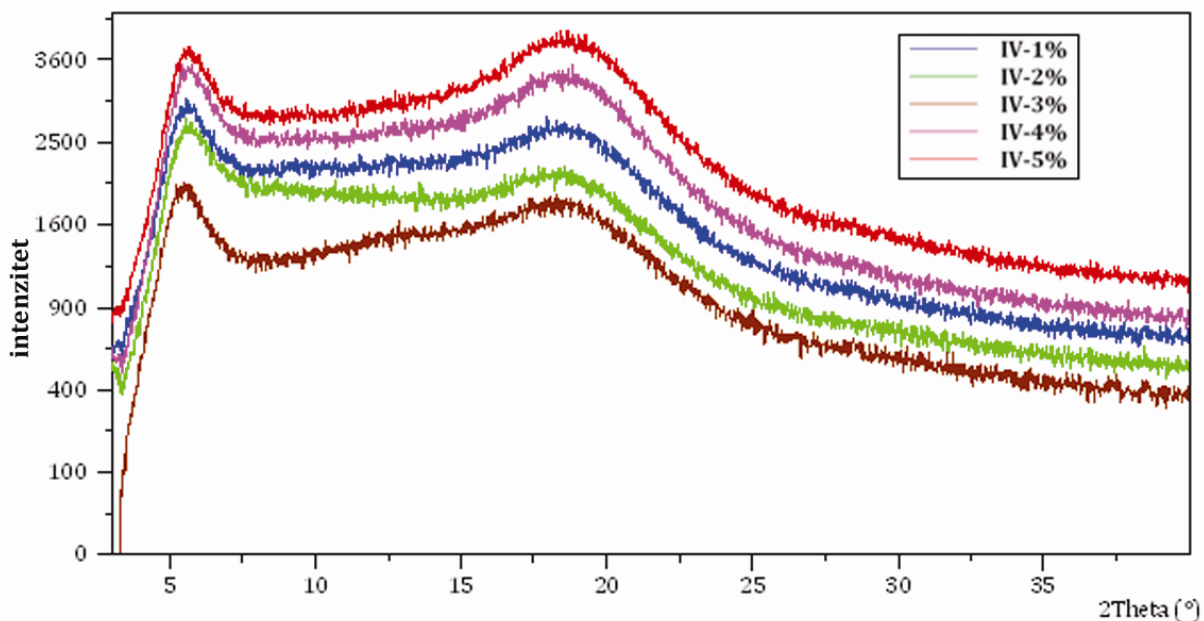
**Tablica 5 – 12.** Volumna raspodjela veličine čestica mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija (1, 2, 3, 4 i 5%, *m/m*)

Mikročestice	Raspodjela veličine čestica [ $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ]		
	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
IV-1%	$4,6 \pm 0,0$	$11,9 \pm 0,0$	$25,7 \pm 0,1$
IV-2%	$2,2 \pm 0,0$	$4,1 \pm 0,0$	$9,2 \pm 0,1$
IV-3%	$1,2 \pm 0,0$	$2,5 \pm 0,0$	$10,6 \pm 0,2$
IV-4%	$1,9 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,0$	$4,2 \pm 0,1$
IV-5%	$2,3 \pm 0,0$	$4,3 \pm 0,0$	$8,9 \pm 0,0$

Legenda: d(0,1), d(0,5) i d(0,9) označava da je 10, 50 i 90% volumne raspodjele mikročestica ispod navedene vrijednosti; SD – standardna devijacija (n=6)

#### **5.3.4. Rendgenska difrakcija mikročestica**

Difraktogrami mikročestica pripremljenih iz otopina različitih koncentracija prikazani su na slici 5 – 13. Svi su uzorci amorfni, bez vidljive kristalizacije lijeka. Iako je koncentracija lijeka i polimera mogla utjecati na način kristalizacije lijeka u mikrokapljici, u ovom pokusu nije bilo nikakve razlike među analiziranim uzorcima.



**Slika 5 – 13.** Difraktogrami mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija (1, 2, 3, 4 i 5%,  $m/m$ )

### 5.3.5. Termička svojstva mikročestica

Termička svojstva mikročestica prikazana su u tablici 5 – 13. Na termogramima reverzibilnog protoka topline postojao je samo jedan staklasti prijelaz za sve mikročestice, što upućuje na činjenicu da koncentracija otopine za raspršivanje nije utjecala na mješivost lijeka i polimera u omjeru 2 : 1 ( $m/m$ ). Naime, prethodno je utvrđeno da brzina nastanka amorfne smjese lijeka i polimera može utjecati na položaj staklastog prijelaza ili razdvajanje faza. Amorfne smjese nastale sporijim procesom (npr. hlađenjem pri primjeni *film-casting* metode) imaju niže staklište (Janssens i sur., 2010) od brzih procesa (npr. od sušenja raspršivanjem). S obzirom na to da početna koncentracija otopine za sušenje utječe na brzinu nastanka amorfne smjese, očekivane su i razlike među uzorcima. Međutim, vidljivo je da su staklišta svih analiziranih uzoraka vrlo slična, bez statistički značajne razlike među njima.

**Tablica 5 – 13.** Svojstva mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija (1, 2, 3, 4 i 5%, *m/m*)

Mikročestice	T <sub>g</sub> [°C ± SD]	Ostatna otapala [% ± SD]
IV-1%	66,7 ± 1,1	1,14 ± 0,17*
IV-2%	65,5 ± 2,5	1,17 ± 0,15*
IV-3%	65,5 ± 1,3	1,24 ± 0,05
IV-4%	65,7 ± 2,1	1,08 ± 0,17*
IV-5%	63,1 ± 1,5	1,57 ± 0,06*

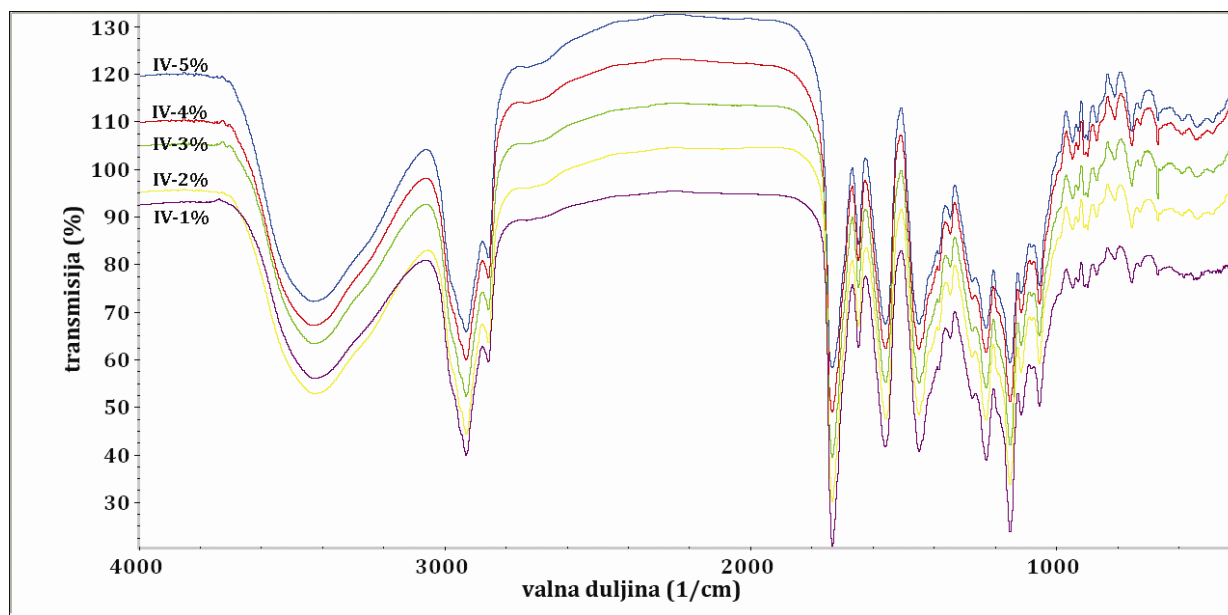
Legenda:

SD – standardna devijacija (n=3); T<sub>g</sub> – temperatura staklišta, \* – statistička razlika u usporedbi s mikročesticama IV-5% (*P*>0,05)

Uzorci pripremljeni iz otopine najviše koncentracije imali su najveću količinu ostatnih otapala (~1,6%), i oni se i statistički razlikuju od većine drugih uzoraka (tabl. 5 – 13). Najveći udio ostatnih otapala također je povezan s najnižom prosječnom temperaturom staklišta (63 °C), što također može potvrditi plastificirajući učinak otapala na smjesu lijeka i polimera.

### **5.3.6. FTIR spektroskopija mikročestica**

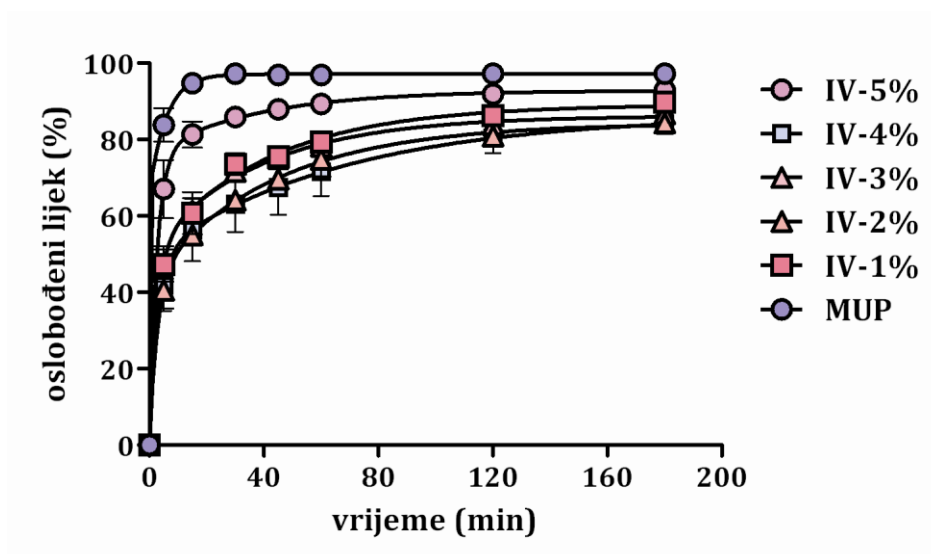
FTIR spektri mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija (sl. 5 – 14) pokazuju da među mikročesticama nema bitne razlike u poziciji IR vrpci. Međusobno miješanje polimera i lijeka nije bilo uvjetovano promjenom koncentracije otopine za sušenje raspršivanjem.



**Slika 5 – 14.** FTIR spektri mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija: 1%, 2%, 3%, 4% i 5% (*m/m*)

### **5.3.7. In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica**

Na slici 5 – 15 prikazani su profili oslobađanja lijeka iz mikročestica sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija (od 1 do 5%) sa stalnim omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*). Vidljivo je da je početno oslobađanje lijeka iz mikročestica dobivenih iz 5-postotne otopine (IV-5%) brže nego iz svih ostalih uzoraka.



**Slika 5 – 15.** *In vitro* oslobađanje lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija: 1%, 2%, 3%, 4% i 5% (*m/m*)

Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka uz primjenu monoeksponecijalnih i bieksponencijalnih jednadžbi prikazano je u tablici 5 – 14. Najbolje slaganje opetovano je ostvareno za bieksponencijalne modele, što upućuje na dvije zasebne faze oslobađanja lijeka. Količina lijeka oslobođenoga u brzoj fazi iz mikročestica izrađenih iz najkoncentriranije otopine (5-postotne) bila je najviša i dosežala je 76% (parametar A,  $75,9 \pm 1,0\%$ ). Ta je vrijednost bila znatno viša ( $P < 0,05$ ) nego za ostale mikročestice, za koje je početno oslobađanje lijeka bilo između 43 i 50%.

Konstanta brzine brze faze oslobađanja lijeka ( $k_1$ ) za mikročestice IV-5% bila je  $0,424 \pm 0,017 \text{ min}^{-1}$ , dok se za ostale mikročestice kretala između  $0,315 \pm 0,006$  i  $0,380 \pm 0,109 \text{ min}^{-1}$ . Usporedbe konstanta brzina brzih faza oslobađanja lijeka ne pokazuju razlike među mikročesticama ( $P > 0,05$ ).

**Tablica 5 - 14.** Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz otopina različitih koncentracija: 1%, 2%, 3%, 4% i 5% (*m/m*)

Mikročestice	Monoekspencijalni model $Q = a(1 - e^{-kt})$			Biekspencijalni model $Q = A(1 - e^{-k_1t}) + B(1 - e^{-k_2t})$				
	R <sup>2</sup>	a [% ± SEM]	k [min <sup>-1</sup> ± SEM]	R <sup>2</sup>	A [% ± SEM]	k <sub>1</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]	B [% ± SEM]	k <sub>2</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]
IV-5%	0,989	88,5 ± 1,6	0,271 ± 0,036	1,000	75,9 ± 1,0	0,424 ± 0,017	16,8 ± 1,5	0,027 ± 0,003
IV-4%	0,931	73,9 ± 4,0	0,112 ± 0,037	1,000	49,2 ± 0,2	0,315 ± 0,006	37,2 ± 0,7	0,015 ± 0,000
IV-3%	0,943	78,8 ± 3,3	0,134 ± 0,028	0,994	50,6 ± 3,6	0,376 ± 0,063	35,6 ± 5,3	0,025 ± 0,005
IV-2%	0,999	76,4 ± 3,9	0,090 ± 0,026	0,999	43,1 ± 2,0	0,358 ± 0,040	41,2 ± 3,2	0,023 ± 0,002
IV-1%	0,949	80,9 ± 3,7	0,121 ± 0,034	0,998	50,0 ± 5,9	0,380 ± 0,109	39,1 ± 8,9	0,025 ± 0,006

Legenda:

Q – postotak lijeka oslobođen u vremenu t; a – „plato“ vrijednost; k, k<sub>1</sub> i k<sub>2</sub> – konstante brzina; SEM – standardna pogreška; A i B – parametri koji označavaju udio lijeka oslobođenoga u brznoj i usporenoj fazi oslobađanja lijeka; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; <sup>(M),(B)</sup> – monoekspencijalni ili biekspencijalni model preferirani matematički su model (nakon usporedbe modela F-testom sume kvadrata)

Profili oslobađanja lijeka iz mikročestica otkrivaju da se brzina oslobađanja mijenja s koncentracijom otopine za sušenje, ali ne linerano. Povećanje koncentracije od 1 do 4% nije jače utjecalo na promjenu oslobađanja lijeka, ali je porast na 5% ( $m/m$ ) doveo do znatnog ubrzanja početnog oslobađanja lijeka i slabije ukupne kontrole.

Karakterizacija čvrstog stanja mikročestica nije pokazala razlike među mikročesticama iako je njihova funkcionalnost uvelike različita. Dodatno, ako se i mikročestice IV-1% isključe iz procjene zbog različite morfologije i veličine čestica, svi ostali su uzorci sličnih dimenzija. Mikročestice IV-5% imaju usporedivu veličinu s mikročesticama IV-2% i IV-3%, dok su IV-4% mikročestice još sitnije, ali sposobne osigurati kontrolirano oslobađanje.

Promjena početne koncentracije otopine za raspršivanje utječe na trenutak nastanka čvrste mikročestice pod jednakim uvjetima sušenja (Elversson i Millqvist-Fureby, 2005a; Elversson i Millqvist-Fureby, 2005b). Očvršćivanje se događa brže i ranije u procesu sušenja iz koncentriranijih otopina (Lechuga-Ballesteros i sur., 2008). Rano taloženje komponenti zbog visoke početne zasićenosti onemogućuje sažimanje/smanjivanje mikrokapljice i povećanje njezine gustoće. Mikrokapljice su zapravo „smrznute“ te polimerni lanci ostaju „labavo“ pakirani (Yeo i Park, 2004). Čini se da je u ispitivanim uvjetima sušenja 5-postotna otopina imala previsoku početnu koncentraciju koja je potaknula rano formiranje mikročestica s manjkavom kontrolom oslobađanja lijeka. Također, rano stvaranje vanjske „kore“ može dovesti da povećanog uklapanja ostatnih otapala u tijelu mikročestice kakvo je dobiveno za mikročestice IV-5% (1,6%, tabl. 5 – 13). Ta otapala također mogu pridonijeti plastifikaciji polimernog matriksa i pogodovati bržem oslobađanju lijeka.

Nedavna istraživanja provedena na mikročesticama Eudragita® L dobivenim sušenjem raspršivanjem na tragu su sličnih zaključaka (Rizi i sur.). Ovim je istraživanjem dokazano da početna koncentracija otopine za sušenje utječe na morfološka i funkcionalna svojstva mikročestica, a zbog formiranja poroznih struktura i/ili taloženja lijeka na površini. Bitno je razumjeti da povećanje koncentracije otopine za raspršivanje (uz stalan omjer lijeka i polimera), zbog stalne potrebe za povećanjem ekonomičnosti procesa ili



zaštite okoliša od otapala, može promijeniti funkcionalnost mikročestica (primarno način oslobađanja lijeka)(Rizi i sur.).

## **5.4. Utjecaj otapala na svojstva mikročestica i njihovu fizičku stabilnost**

Otapalo upotrijebljeno za pripremu otopine za raspršivanje utječe na nekoliko vrlo važnih činitelja koji određuju svojstva i funkcionalnost mikročestica dobivenih sušenjem raspršivanjem. Naime, otapalo utječe na: a) topljivost polimera i konformaciju polimernih lanaca (Miller-Chou i Koenig, 2003), b) kinetiku očvršćivanja pri konstantnim uvjetima sušenja koji su povezani s (i) brzinom isparavanja otapala određenom temperaturom i energijom isparavanja (Raula i sur., 2004) (ako je riječ o smjesi otapala, u raspršenoj kapljici najprije isparavaju otapala s nižom temperaturom isparavanja, a naknadno isparava manje hlapljivo otapalo; (Wulsten i sur., 2009) i (ii) početnim zasićenjem otopljenih komponenti.

Kao što je prethodno opisano u literaturi, otapalo ima velik utjecaj na morfologiju (Esposito i sur., 2000; Gander i sur., 1995; Wulsten i sur., 2009; Zhang i sur., 2000) i gustoću mikročestica (Bain i sur., 1999) koje su izravno povezane s načinom oslobađanja lijeka.

Sterička konformacija polimernih lanaca u različitim je otapalima različita. U dobrim otapalima polimeri su nasumično konformirani i tvore rastegnute lance, dok u lošim otapalima i razrijeđenim otopinama postoje u kolabiranim, globularnim strukturama. Dodatno, u lošim otapalima mogu postojati područja bogatija ili siromašnija polimerom (Luna-Barcenás i sur., 1997) i ona ometaju sposobnost polimera da uđe u interakciju s lijekom. Brzina isparavanja otapala i kinetika očvršćivanja utječu na koherentnost polimernog matriksa i razinu naprezanja u sustavu (Al-Obaidi i sur., 2009). Gušći polimerni matriks onemogućuje pokretljivost pojedinačnih lanaca zbog smanjenoga slobodnog volumena, istodobno smanjujući prodor medija za oslobađanje lijeka u unutrašnjost mikročestice (Bain i sur., 1999).

#### ***5.4.1. Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka***

Mikročestice s omjerima lijeka i polimera 2 : 1 i 5 : 1 (*m/m*) izrađene su iz različitih otapala:

- a) iz metanola,
- b) iz metanol-etanolske smjese (50 : 50, *m/m*),
- c) iz izopropanol-acetonske smjese (40 : 60, *m/m*),

te podvrgnute sušenju raspršivanjem pri konstantnim procesnim uvjetima. Uklapanje lijeka bilo je vrlo uspješno za sve pripremljene mikročestice i kretalo se između 99,0 i 102,3%

(tabl. 5 – 15). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem bilo je između 56 i 66% za sva upotrijebljena otapala (tabl. 5 – 15).

**Tablica 5 – 15.** Svojstva mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*) (mikročestice I) i 2 : 1 (*m/m*) (mikročestice IV)

Mikročestice	Otapalo	Iskorištenje procesa [%]	Sadržaj lijeka u mikročesticama [% ± SD]	Uspješnost uklapanja lijeka [% ± SD]
Ia	metanol	55,8	16,1 ± 0,2	102,3 ± 1,1
Ib	metanol : etanol (50 : 50, <i>m/m</i> )	56,0	15,6 ± 0,1	99,1 ± 0,9
Ic	aceton : izopropanol (40 : 60, <i>m/m</i> )	62,6	15,2 ± 0,1	99,6 ± 0,6
IVa	metanol	62,6	64,1 ± 0,3	101,7 ± 0,4
IVb	metanol : etanol (50 : 50, <i>m/m</i> )	62,7	62,4 ± 0,5	99,1 ± 0,8
IVc	aceton : izopropanol (40 : 60, <i>m/m</i> )	65,8	61,1 ± 0,4	99,0 ± 0,6

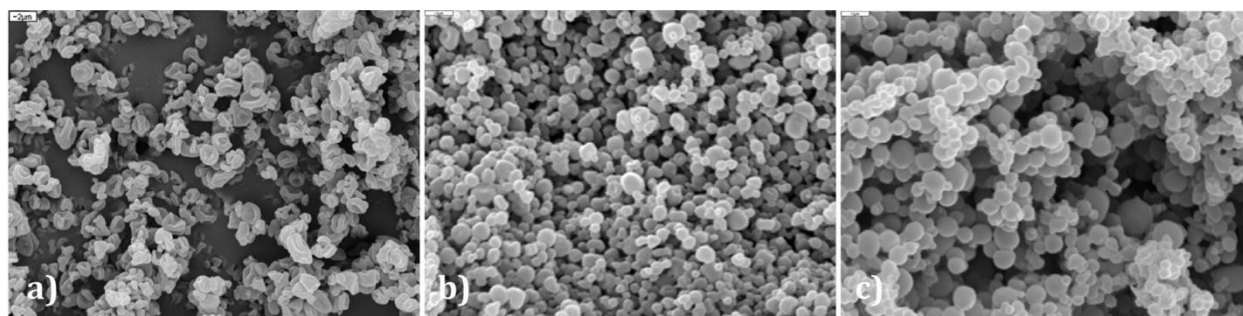
Legenda:

iskorištenje procesa (%) – omjer mase dobivenih mikročestica i mase ukupnih sastojaka dodanih u otopinu za raspršivanje; uspješnost uklapanja lijeka (% *m/m*) – omjer stvarnoga i teoretskog (dodanog) sadržaja mupirocin kalcija u mikročesticama; SD – standardna devijacija (n=3)

#### 5.4.2. Morfologija mikročestica

Sve pripremljene mikročestice bile su u obliku bijeloga, sipkog praška. Kao što je vidljivo iz slike 5 – 16, utjecaj otapala na morfologiju mikročestica bio je vrlo velik. Slika 5 – 16. prikazuje mikročestice s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*), sušene raspršivanjem iz različitih otapala. Mikročestice Ia (sl. 5 – 16. a) vrlo su naborane i smežurane, što se može pripisati ranom očvršćivanju mikrokapljica u procesu sušenja koji je započeo stvaranjem savitljivoga površinskog sloja, koji se naknadno deformirao zbog povećanoga unutarnjeg tlaka prouzročenoga ispravljanjem otapala (Raula i sur., 2004; Rizi i sur., 2011). Smjese otapala, metanol-etanolska i aceton-izopropanolska, omogućile su nastanak sferičnih mikročestica (Ib i Ic) s glatkom površinom i bez vidljivih pora (sl. 5 – 16. b – c). Glatke površine nastaju očvršćivanjem polimera na dovoljno visokim tempera-turama, koje

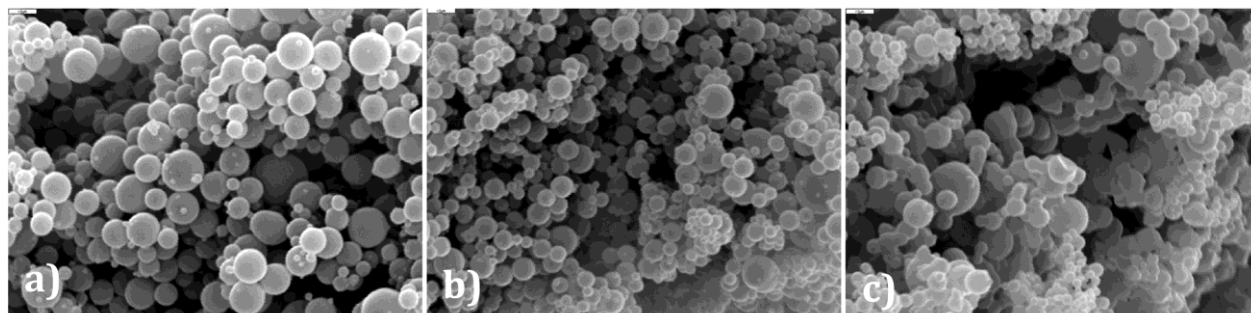
su dostatne za održavanje polimera u viskoelastičnom stanju (izlazne su temperature bile između 56 i 69 °C), omogućujući da se dogode nužni relaksacijski procesi. Etanol je bolje otapalo za polimer te pridonosi produženju vremena sušenja mikrokapljica i odgađa početak očvršćivanja. Njegovo više vrelište također može utjecati na produženje vremena sušenja uz pretpostavku konstantne ulazne temperature. Mikrokapljice su imale dovoljno vremena da smanje svoj promjer, uz očuvanje sferičnog oblika. Smjesa aceton-izopronol dodatno je poboljšala topljivost polimera, što je opet omogućilo nastanak sferičnih mikročestica bez preranoga površinskog taloženja. Pretpostavlja se da je utjecaj lijeka i njegove topljivosti u tim uzorcima manje bitan jer je udio lijeka na razini od 15 – 16% ( $m/m$ ).



**Slika 5 – 16.** SEM slike mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolne smjese (50 : 50,  $m/m$ ) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60,  $m/m$ )

Slika 5 – 17. prikazuje mikročestice s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) pripremljene iz različitih otapala. Mikročestice IVa i IVb, pripremljene iz metanola i metanol-etanolne smjese, bile su sferične (sl. 5 – 17. a – b). Usprkos visokom udjelu lijeka u mikročesticama, lijek nije kristalizirao. Topljivost lijeka u navedenim otapalima bila je visoka te je očvršćivanje mikrokapljica počelo kasnije u procesu sušenja, omogućujući zadržavanje izvorne morfologije. Nadalje, aceton-izopropanolska smjesa znatno je smanjila topljivost lijeka, istodobno djelujući kao izvrsno otapalo za polimer. Zbog takvih odnosa topljivosti lijeka i polimera očekivano je da će polimer postići točku očvršćivanja prije nego lijek. Te mikročestice nisu pravilne sfere (sl. 5 – 17. c). Očvršćivanje mikrokapljica vjerojatno je nas-

talo u neposrednoj blizini raspršivača, inicirano brzim taloženjem lijeka, i formiralo je nepravilne i aglomerirane mikročestice.



**Slika 5 – 17 .** SEM slike mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolске smjese (50 : 50,  $m/m$ ) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60,  $m/m$ )

#### **5.4.3. Veličina čestica**

Volumna raspodjela veličine čestica prikazana je u tablici 5 – 16. Mikročestice Ia nešto su sitnije od mikročestica Ib i Ic, kojima je  $d(0,9)$  veći od 14  $\mu m$ . Nasuprot njima, IVb su najmanje mikročestice ( $d(0,9) < 7 \mu m$ ) dobivene iz otopine s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ). Mikročestice IVc imaju najveći  $d(0,9)$  parametar, nastao zbog vidljive aglomeracije i sljepljivanja mikročestica.

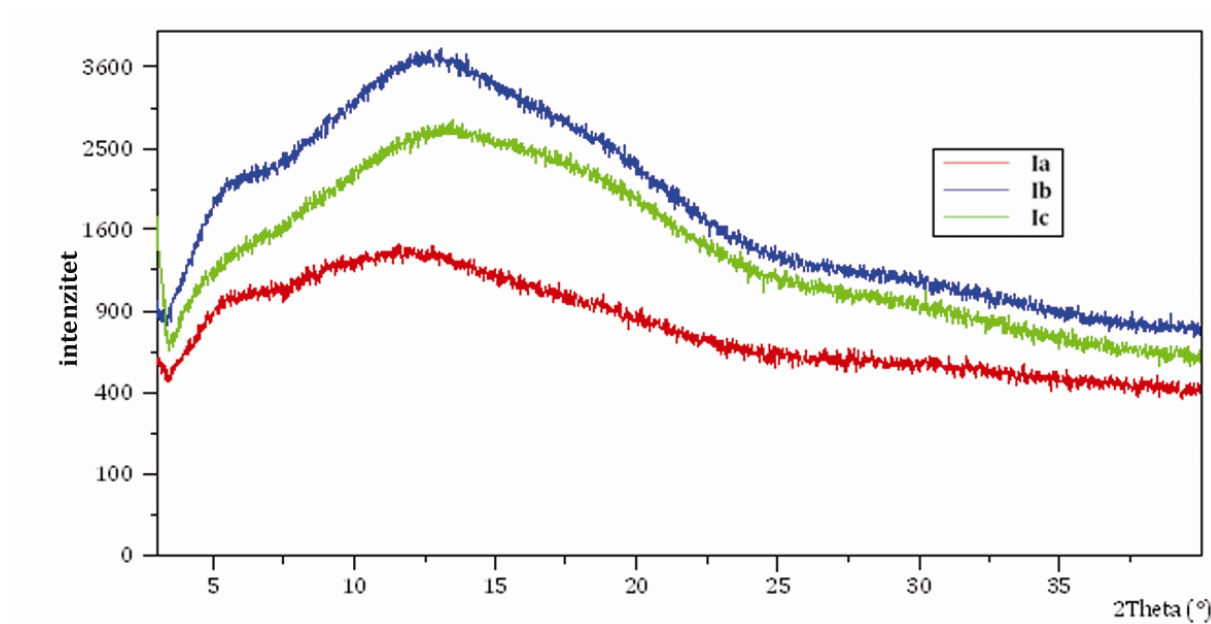
**Tablica 5 – 16.** Volumna raspodjela veličine čestica uzoraka s omjerima lijeka i polimera 1 : 5 i 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50, *m/m*) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60, *m/m*)

Mikročestice	Raspodjela veličine čestica [ $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ]		
	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
Ia	1,4 $\pm$ 0,0	2,8 $\pm$ 0,1	7,0 $\pm$ 0,2
Ib	3,4 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2	23,6 $\pm$ 0,0
Ic	2,6 $\pm$ 0,0	5,7 $\pm$ 0,0	13,6 $\pm$ 0,0
IVa	1,2 $\pm$ 0,0	3,1 $\pm$ 0,0	10,1 $\pm$ 0,2
IVb	2,0 $\pm$ 0,0	3,7 $\pm$ 0,0	6,9 $\pm$ 0,0
IVc	4,1 $\pm$ 0,0	9,5 $\pm$ 0,0	21,5 $\pm$ 0,3

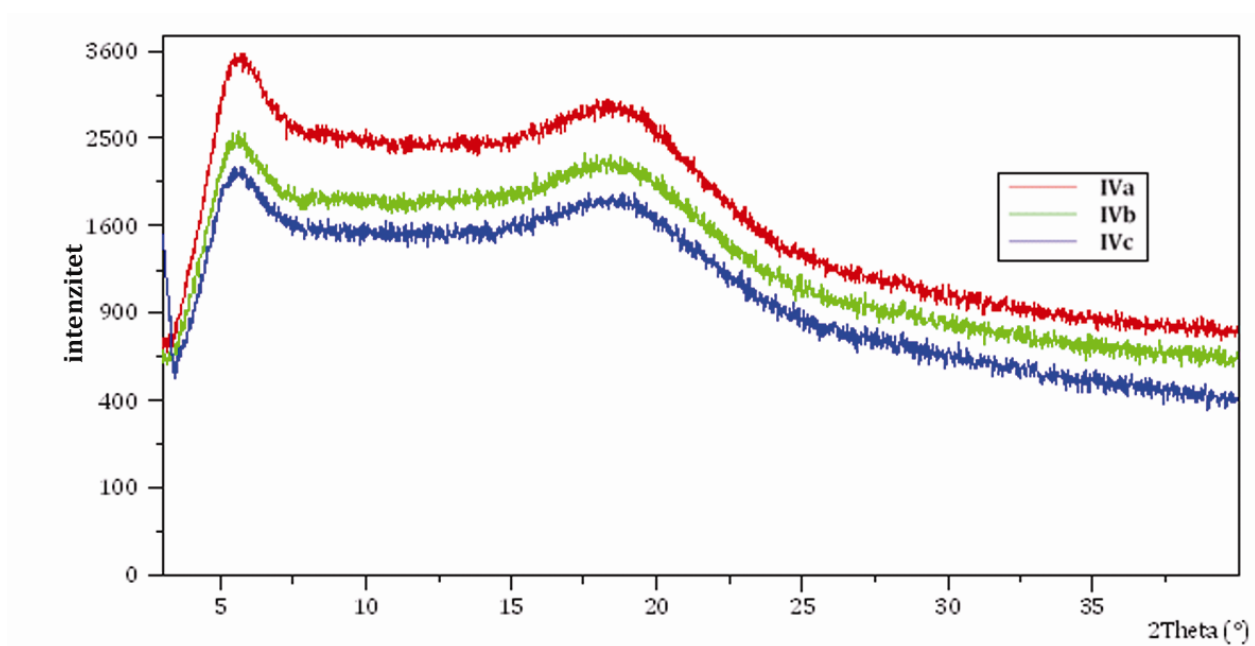
Legenda: d(0,1), d(0,5) i d(0,9) označavaju da je 10, 50 i 90% volumne raspodjele mikročestica ispod navedene vrijednosti; SD – standardna devijacija (n=6)

#### **5.4.4. Rendgenska difrakcija mikročestica**

Difraktogrami mikročestica pripremljenih iz različitih otapala prikazani su na slikama 5 – 18. i 5 – 19. Vidljivo je da ni na jednome od njih nema „pikova“ koji bi odgovarali kristalnom lijeku te da je tijekom procesuiranja otopine za sušenje došlo do potpune amorfizacije lijeka, bez obzira na omjer lijeka i polimera ili upotrijebljeno otapalo. Brzina taloženja lijeka također nije utjecala na pojavu kristalizacije lijeka.



**Slika 5 – 18.** Difraktogram mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolске smjese (50 : 50,  $m/m$ ) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60,  $m/m$ )



**Slika 5 – 19.** Difraktogram mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolске smjese (50 : 50,  $m/m$ ) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60,  $m/m$ )



#### 5.4.5. Termička svojstva mikročestica

Termička svojstva mikročestica prikazana su u tablici 5 – 17. Temperature staklišta dobivene iz termograma reverzibilnog protoka topline pokazuju razlike termičkih svojstava mikročestica ovisno o uporabljenom otapalu. Kad je rabljen metanol, staklište je bilo najniže ( $58,4 \pm 2,2$  °C), dok je za smjese metanol-etanol ( $63,4 \pm 1,0$  °C) i aceton-izopropanol ( $68,7 \pm 1,1$  °C) staklište postupno raslo. Al-Obaidi i sur. (2009) opisali su sličan fenomen pripisujući ga postojanju različitih konformacija polimernih lanaca zbog različitih afiniteta prema otapalima. U tom specifičnom slučaju najviše staklište imao je sustav u kojemu je polimer imao najveću topljivost, što se pokazalo i u našem primjeru. Više vrijednosti staklišta koja pozitivno odstupaju od GT predviđenih vrijednosti pokazuju da postoje jače međumolekulske sile koje je potrebno prevladati kako bi smjesa lijeka i polimera prešla iz staklastoga u viskoelastično stanje (van Drooge i sur., 2006). Treba naglasiti da je količina preostalih otapala u mikročesticama (Ia) s najnižim staklištem ( $58,4 \pm 2,2$  °C) također bila najmanja (0,9%) te se njihov plastifikacijski učinak ne može smatrati uzrokom smanjene temperature staklišta.

**Tablica 5 – 17.** Svojstva mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 i 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50, *m/m*) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60, *m/m*)

Mikročestice	$T_g$ [°C ± SD]	GT [°C]	Ostatna otapala [% ± SD]
Ia	$58,4 \pm 2,2$	~59,5	$0,9 \pm 0,0$
Ib	$63,4 \pm 1,0$	~59,5	$1,0 \pm 0,2$
Ic	$68,7 \pm 1,1$	~59,5	$1,3 \pm 0,1$
IVa	$68,1 \pm 1,7$	~69,3	$1,0 \pm 0,1$
Ivb	$66,7 \pm 0,6$	~69,3	$1,6 \pm 0,0$
IVc	~61 i ~68	~69,3	$2,2 \pm 0,1$

Legenda:

SD – standardna devijacija (n=3);  $T_g$  – temperatura staklišta; GT – izračunana temperatura staklišta za smjese lijeka i polimera prema Gordon-Taylorovoj jednadžbi

Nadalje, termogrami reverzibilnog protoka topline za mikročestice s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) izrađene iz metanola (IVa) i metanol-etanolske smjese (IVb) imaju samo jedan termički događaj (tabl. 5 – 17). Jedinstvena temperatura staklišta potvrđuje ostvarenu mješivost polimera i lijeka bez tragova separacije faza. Predviđena GT temperatura staklišta za taj omjer lijeka i polimera je 69,3 °C ako se zanemare razlike u gustoći. Temperature staklišta za mikročestice IVa i IVb dobro su odgovarale predviđenim vrijednostima. Međutim termogram reverzibilnog protoka topline za mikročestice IVc pokazao je dva uzastopna termička događaja koji se pojavljuju na ~61 °C i ~68 °C, potvrđujući odvajanje faza. Najviše ostatnog otapala (2,2%) pronađeno je u uzorcima izrađenima iz aceton-izopropanolske smjese.

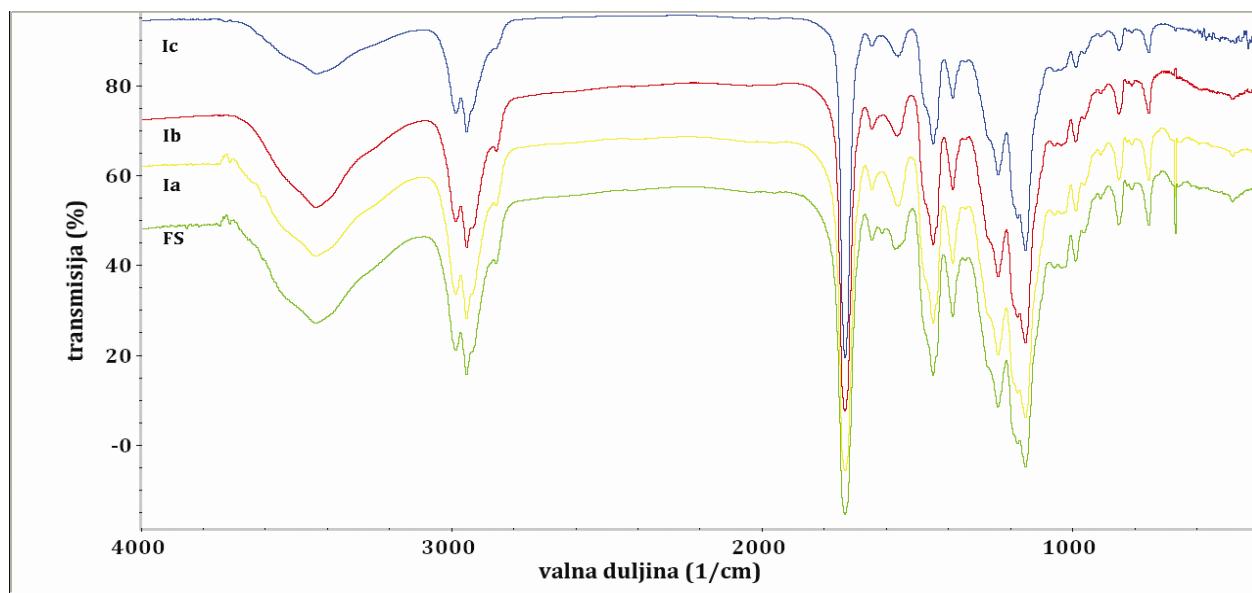
Navedeni rezultati pokazuju da je mješivost lijeka i polimera određena otapalom, uz stalan sastav i procesne uvjete sušenja raspršivanjem. Uzroci takvih rezultata mogu ležati u lošoj topljivosti lijeka u danom otapalu. S bzirom na to da je topljivost lijeka znatno smanjena, njegovo je rano taloženje očekivano, dok istodobno polimer ne postiže točku zasićenost u mikrokapljici. Očito je da je jedan od preuvjeta istodobnog očvršćivanja polimera i lijeka njihova približno jednaka topljivost u zajedničkom otapalu. Janssens i sur. (2010) nedavno su objavili istraživanje o važnosti kinetike sušenja za mješivost lijeka i polimera, iznoseći znatne razlike u mješivosti pri *film-cast* metodi i pri sušenju raspršivanjem.

#### **5.4.6. FTIR analize mikročestica**

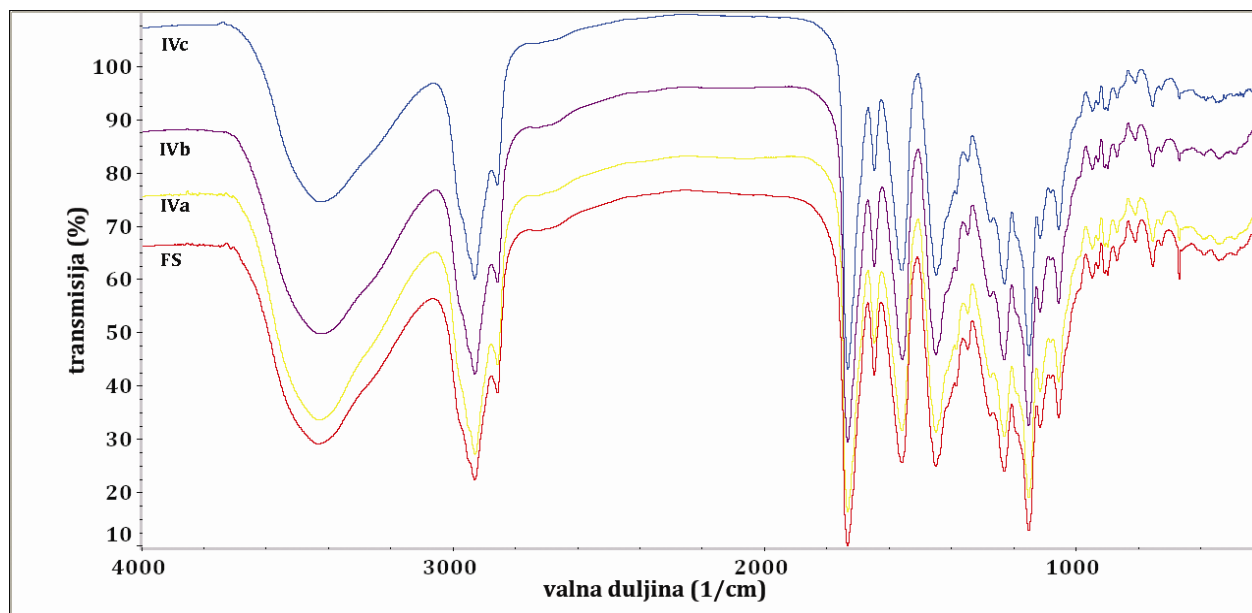
FTIR analize mikročestica primarno su provedene radi provjere potencijalnih interakcija između lijeka i polimera koje su rezultat uporabe različitih otapala. FTIR snimke prikazane su na slikama 5 – 20. i 5 – 21. Identični spektri dobiveni su snimanjem mikročestica Ia – c i njihovih fizičkih smjesa, kao i mikročestica IVa – c i njihovih fizičkih smjesa, bez ikakvih pomaka u specifičnim IR vrpčama.

Ti rezultati isključuju jače intermolekulske sile kao uzrok povišenja temperature staklišta za mikročestice Ib i Ic. Potencijalni razlog za uočene razlike u  $T_g$  temperaturama može biti razlika u molekulskom pakiranju (tj. u slobodnom volumenu) polimernih lanaca

uzrokovanih različitim konformacijama u različitim otapalima. Slične su rezultate objavili su Tajber i sur. (2005) za polivinilpirolidonske čvrste disperzije.



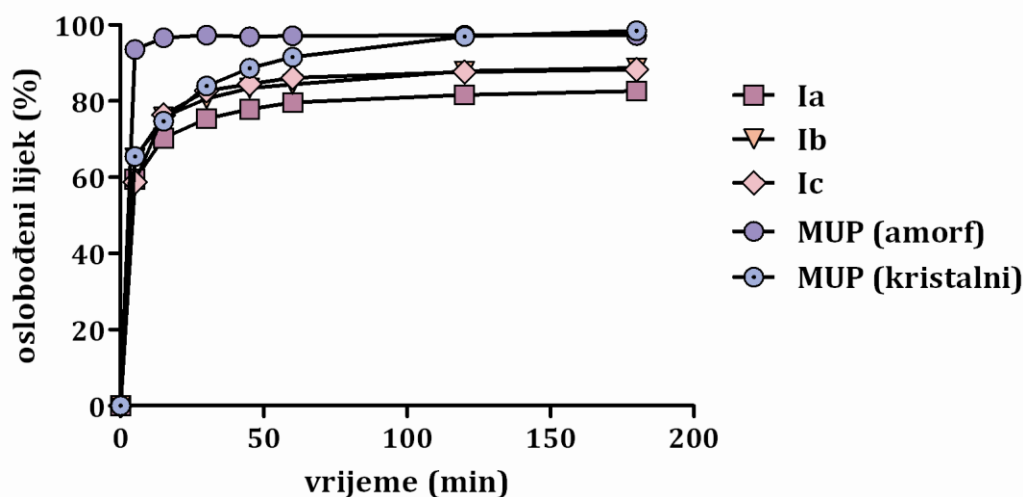
**Slika 5 - 20.** FTIR spektri mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50, *m/m*) i c) aceton-izopropanskog smjese (40 : 60, *m/m*) u usporedbi s fizičkim smjesama (FS) lijeka i polimera



**Slika 5 - 21.** FTIR spektri mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50, *m/m*) i c) aceton-izopropanskog smjese (40 : 60, *m/m*) u usporedbi s fizičkim smjesama (FS) lijeka i polimera

#### 5.4.7. In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica

Na slici 5 – 22. prikazani su profili oslobađanja lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz različitih otapala. Iz njih se lako uočava slaba kontrola oslobađanja lijeka iz mikročestica, uz iznimno brzo oslobađanje lijeka u početnim točkama krivulje. Takva je pojava opširno opisana u literaturi o mikročesticama s kontroliranim oslobađanjem lijeka (Allison, 2008; Yeo i Park, 2004) i veliki je izazov istraživačima. Opisuju se kao nekontrolirano početno oslobađanje lijeka, koje se pojavljuje odmah nakon dodira mikročestica s disolucijskim medijem (Allison, 2008). Često se povezuje s nehomogenom raspodjelom lijeka unutar mikročestica ili njegovim postojanjem na površini mikročestica (Yeo i Park, 2004). Može ga uvjetovati i velika poroznost ili niska gustoća mikročestica. Difuzijski procesi unutar čestica mikronskih dimenzija također su ograničavajući činitelj u ostvarivanju kontroliranog oslobađanja lijeka (Vehring, 2008).

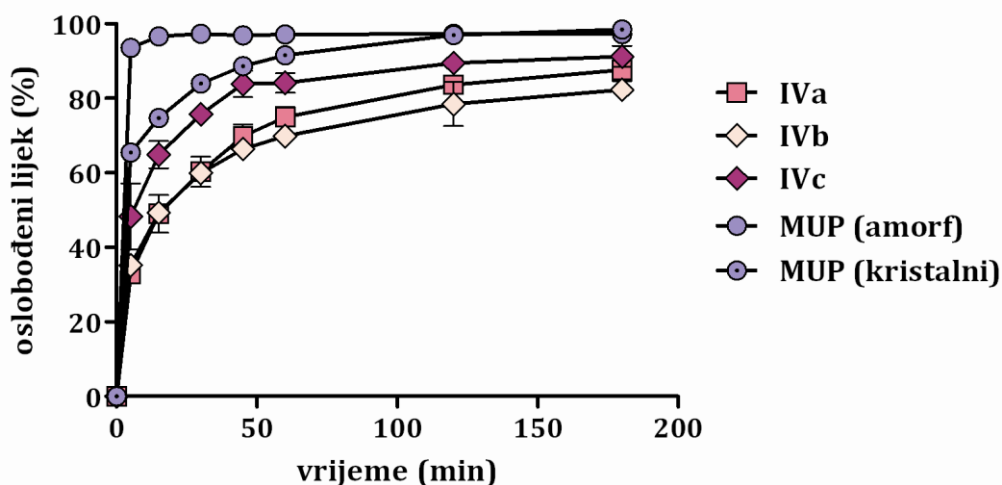


**Slika 5 – 22.** *In vitro* oslobađanje lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolске smjese (50 : 50,  $m/m$ ) i c) acetón-izopropanolske smjese (40 : 60,  $m/m$ )

Oslobađanje lijeka iz mikročestica dobivenih iz različitih otapala uspoređeno je s kristalnim i amorfnim oblikom samog lijeka. Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka provedeno je primjenom monoeksponencijalnih i bieksponencijalnih jednadžbi te je njihova prikladnost testirana F-testom sume kvadrata (tabl. 5 – 18). Najbolje slaganje ostvareno je

za bieksponecijalne modele. Početno oslobođena količina lijeka varirala je između  $62,8 \pm 3,6$  i  $69,7 \pm 2,0\%$  (parametar A, tabl. 5 – 18) s konstantama brzina između  $0,336 \pm 0,024$  i  $0,457 \pm 0,073 \text{ min}^{-1}$ ; bez statistički značajne razlike među uzorcima s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 ( $m/m$ ) ( $P > 0,05$ ).

Jedan od uzroka brzoga početnog oslobađanja lijeka može biti promjena fizičkog oblika lijeka, iz manje topljivoga kristalnog u bolje topljiv amorfni oblik. Oslobađanje lijeka iz mikročestica evidentno je sporije u usporedbi s amorfnim oblikom lijeka (sl. 5 – 22). Međutim, brzo početno oslobađanje može biti uzrokovano i brzim taloženjem polimera zbog njegove visoke početne zasićenosti. Variranjem otapala nastojalo se utjecati na dinamiku taloženja polimera, tj usporiti njegovo taloženje. Promjena otapala rezultirala je nastankom mikročestica modificiranih fizičkih obilježja, ali bez znatnog utjecaja na način oslobađanja lijeka. Iako su mikročestice Ic, izrađene iz aceton-izopropanolske smjese, imale više vrijednosti staklišta, što upućuje na moguću veću gustoću mikročestica, te razlike nisu utjecale na poboljšanje kontrole oslobađanja lijeka. Razlog neuspjeha može biti paralelno smanjenje topljivosti lijeka u danoj smjesi otapala, što je dovelo do ranijeg taloženja lijeka na površini mikročestica. Očito je potrebno uskladiti taloženje polimera i lijeka te ih usporiti ako se želi postići kontrolirano oslobađanje lijeka.



**Slika 5 – 23.** *In vitro* oslobađanje lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolne smjese (50 : 50,  $m/m$ ) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60,  $m/m$ )

*In vitro* oslobađanje lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) prikazano je slici 5 – 23. Matematičko modeliranje rezultata oslobađanja ponovno je pokazalo da profili odgovaraju biekspencijalnim jednažbama (tabl. 5 – 18). Mikročestice izrađene iz metanola (IVa) i metanol-etanolske smjese (IVc) pokazale su gotovo jednake profile s početnim oslobađanjima od  $31,8 \pm 5,3$  i  $37,2 \pm 3,9\%$  (parametar A, tabl. 5 – 18). Mikročestice IVc, pripremljene iz aceton-izopropanolske otopine, imale su brzo početno oslobađanje lijeka ( $45,5 \pm 9,9\%$ , parametar A), s konstantom brzine oslobađanja  $0,434 \pm 0,193 \text{ min}^{-1}$ . Brzo oslobađanje lijeka nije bilo povezano s veličinom čestica jer su IVc mikročestice dodatno bile aglomerirane (što je moglo uvjetovati otežano oslobađanje lijeka). Pretpostavlja se da je zbog anomalija u mješivost lijeka i polimera postojao izdvojeni dio lijeka, lako dostupan za otapanja odmah nakon dodira s medijem za oslobađanje. Ta je teza dodatno potkrijepljena pojavom separacije faza prema termičkim nalazima. Zbog niske topljivosti lijeka u aceton-izopropanolskoj smjesi, njegovo je taloženje počelo vrlo brzo, onemogućujući daljne sažimanje mikrokapljice i stvaranje koherentnog matriksa. Usporedbom profila oslobađanja mikročestica IVa i IVb s amorfnim oblikom lijeka, lako je uočljivo da te čestice uspješno kontroliraju oslobađanje lijeka, znatno usporavajući profile oslobađanja lijeka.

**Tablica 5 – 18.** Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka iz mikročestica s omjerima lijeka i polimera 1 : 5 i 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50, *m/m*) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60, *m/m*)

Mikročestice	Monoekspencijalni model $Q = a(1 - e^{-kt})$			Biekspencijalni model $Q = A(1 - e^{-k_1t}) + B(1 - e^{-k_2t})$				
	R <sup>2</sup>	a [% ± SEM]	k [min <sup>-1</sup> ± SEM]	R <sup>2</sup>	A [% ± SEM]	k <sub>1</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]	B [% ± SEM]	k <sub>2</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]
Ia <sup>(B)</sup>	0,980	78,3 ± 1,0	0,270 ± 0,024	0,996	62,8 ± 3,6	0,457 ± 0,073	19,5 ± 4,9	0,033 ± 0,008
Ib <sup>(B)</sup>	0,982	83,8 ± 1,0	0,286 ± 0,025	0,998	69,7 ± 2,0	0,455 ± 0,044	19,0 ± 3,0	0,027 ± 0,005
Ic <sup>(B)</sup>	0,990	85,1 ± 0,8	0,220 ± 0,013	0,999	67,3 ± 3,4	0,336 ± 0,024	20,7 ± 4,0	0,042 ± 0,007
IVa <sup>(B)</sup>	0,954	82,7 ± 2,4	0,047 ± 0,006	0,991	31,8 ± 5,3	0,348 ± 0,113	55,8 ± 7,7	0,024 ± 0,003
IVb <sup>(B)</sup>	0,941	75,6 ± 2,2	0,062 ± 0,009	0,993	37,2 ± 3,9	0,336 ± 0,076	45,3 ± 6,1	0,022 ± 0,003
IVc <sup>(B)</sup>	0,953	85,1 ± 1,8	0,119 ± 0,016	0,986	45,5 ± 9,9	0,434 ± 0,193	44,9 ± 12,3	0,037 ± 0,009

Legenda:

Q – postotak lijeka oslobođen u vremenu t; a – „plato“ vrijednost; k, k<sub>1</sub> i k<sub>2</sub> – konstante brzina; SEM – standardna pogreška; A i B – parametri koji predložuju udio lijeka oslobođenoga u brznoj i usporenoj fazi oslobađanja lijeka; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; <sup>(M),(B)</sup> – monoekspencijalni ili biekspencijalni model preferirani su matematički model (nakon usporedbe modela F-testom sume kvadrata)

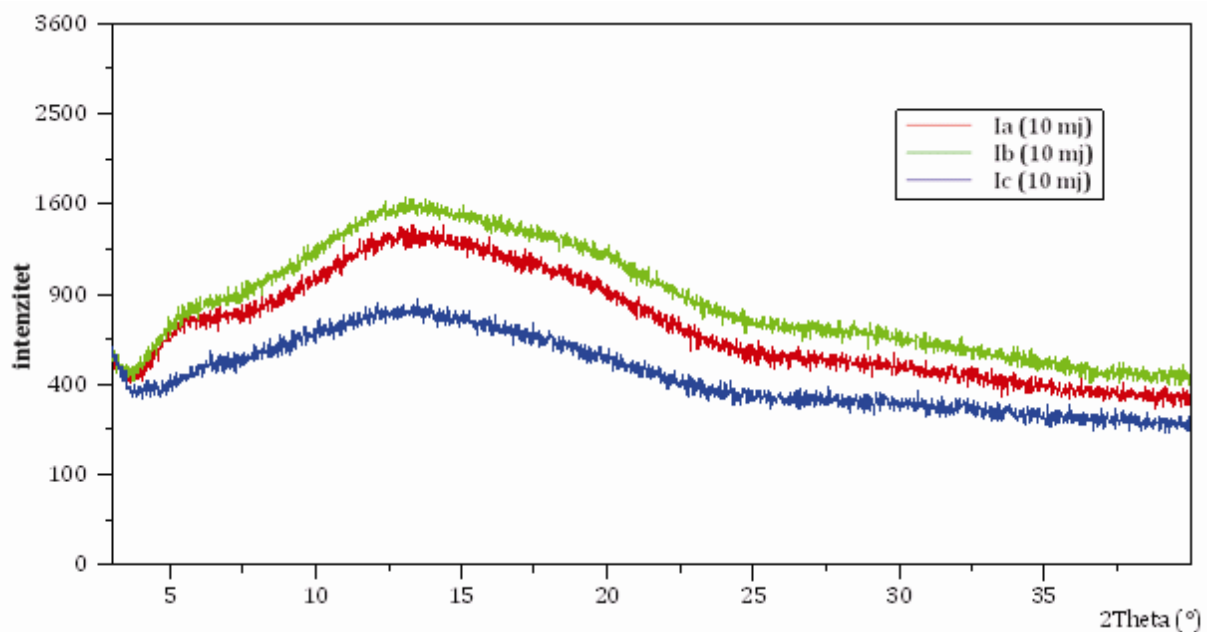
## **5.5. Fizička stabilnost mikročestica izrađenih iz različitih otapala**



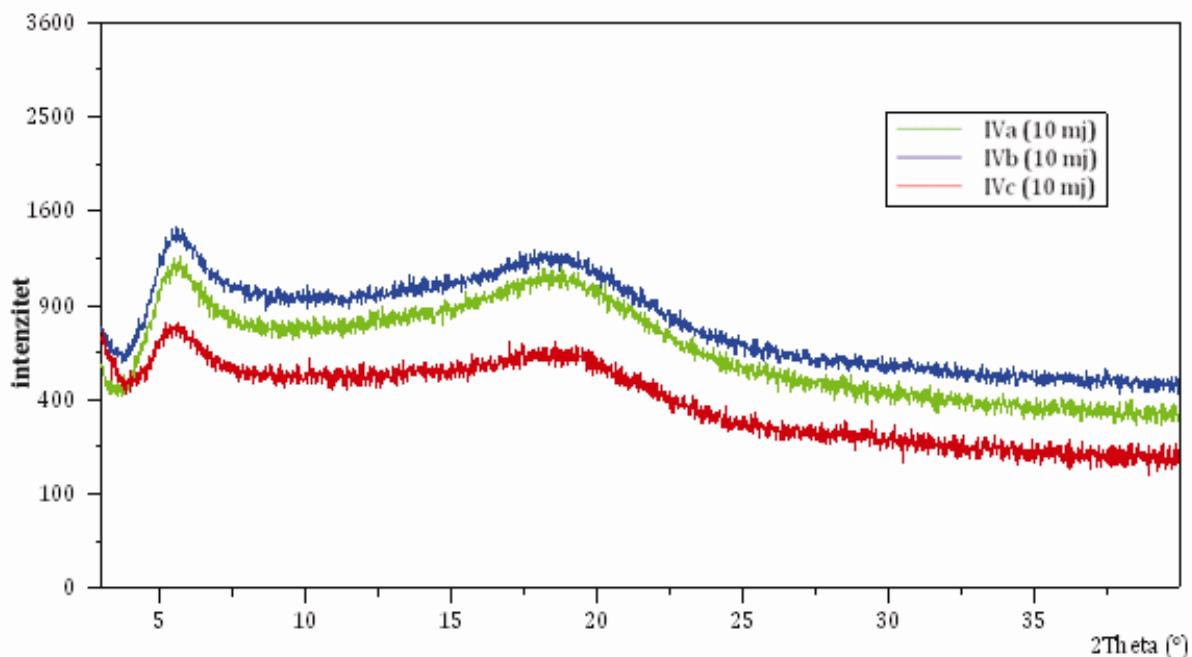
Sušenje raspršivanjem često rezultira nastankom amorfnih struktura. Poznato je da su amorfni oblici podložni strukturnim relaksacijama tijekom uskladištenja, koje karakterizira smanjenje entalpije i slobodnog volumena. Stoga oslobađanje lijeka iz polimernih amorfnih struktura ovisi o varijacijama slobodnog volumena (Rosilio i sur., 1998). Pokretačka snaga koja dovodi do strukturnih relaksacija izravno je povezana s brzinom nastanka mikročestica i ovisi o procesnim parametrima (Allison, 2008). Znanstveni članci o temi mikročestica izrađenih iz poli(laktatno-ko-glikolnih) kiselina pokazuju da proizvodni postupak, ostatna otapala te priroda interakcija između lijeka i polimera utječu na brzinu strukturnih relaksacija (Allison, 2008). Zato uvjeti koji izravno utječu na način formiranja mikročestica (npr. otapalo, početna zasićenost otopine lijeka) mogu biti izvor varijabilnosti u načinu oslobađanja lijeka te mogu utjecati na stabilnost profila oslobađanja tijekom uskladištenja (Allison, 2008; Rosilio i sur., 1998).

### ***5.5.1. Rendgenska difrakcija mikročestica***

Difraktogrami mikročestica pripremljenih iz različitih otapala uskladištenih deset mjeseci na 25 °C/60%RV prikazani su na slikama 5 – 24. i 5 – 25. Vidljivo je da na njima nema „pikova“ koji bi dokazivali postojanje kristalnog lijeka i da je tijekom uskladištenja čvrsta disperzija zadržala amorfnu strukturu. Međutim, kristalizacija lijeka samo je jedna od pojava koja može ugroziti funkcionalnost sustava. Bilo kakva promjena u distribuciji lijeka unutar polimernog matriksa na molekulskoj razini može također ugroziti kvalitetu terapijskog sustava.



**Slika 5 - 24.** Difraktogram mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50,  $m/m$ ) i c) aceton-izopropalnolske smjese (40 : 60,  $m/m$ ) nakon deset mjeseci uskladištenja na 25 °C/60%RV



**Slika 5 - 25.** Difraktogram mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50,  $m/m$ ) i c) aceton-izopropalnolske smjese (40 : 60,  $m/m$ ) nakon deset mjeseci uskladištenja na 25 °C/60%RV

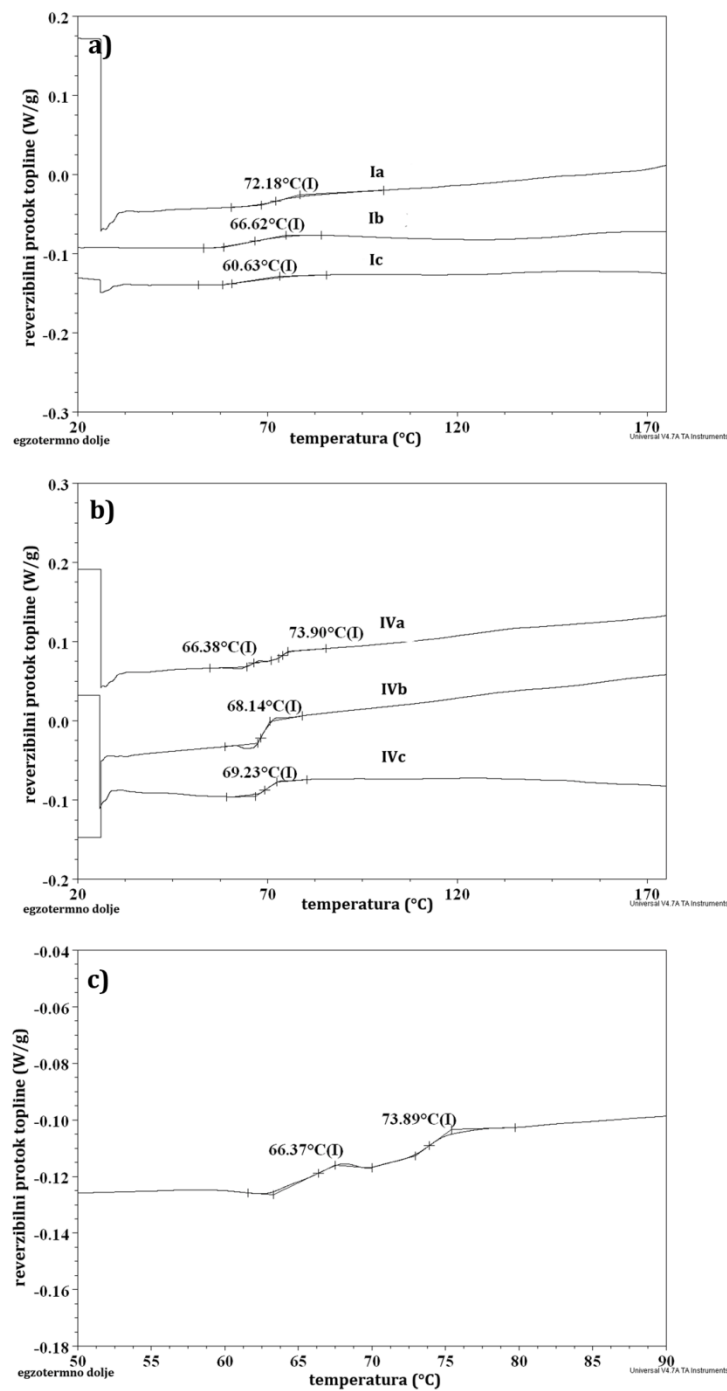
### **5.5.2. Termička svojstva mikročestica**

Termička svojstva mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*) nakon deset mjeseci uskladištenja prikazana su na slici 5 – 26. a. Sve termograme karakterizira jedan staklasti prijelaz koji je bio blago pomaknut prema višim temperaturama u odnosu prema onima s početka ispitivanja stabilnosti. Staklišta mikročestica izrađenih iz metanola, metanol-etanolske i aceton-izopropanolske smjese bila su  $61,0 \pm 0,6$ ,  $66,4 \pm 0,5$  i  $72,2 \pm 1,0$  °C. Dodatno, termičkim analizama nije dokazano postojanje kristalnog lijeka jer je na termogramima izostao prijelaz karakterističan za taljene lijeka.

Čuvanje uzoraka tijekom deset mjeseci nije prouzročilo kristalizaciju lijeka iako su uočene neke promjene termičkih svojstava. S obzirom na to da su mikročestice izrađene metodom koja podrazumijeva brzo uklanjanje otapala i očvršćivanje, polimerni su lanci imobilizirani u nastojanju da postignu ravnotežno stanje (Allison, 2008; Tajber i sur., 2005). Porast temperature staklišta tijekom uskladištenja može se pripisati lokalnim molekulskim preslagivanjima unutar dostupnoga slobodnog volumena, dok se sustav nastoji termički uravnotežiti.

Termogrami reverzibilnog protoka topline za mikročestice s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) (sl. 5 – 26. b) pokazuju da se staklište za IVa i IVb mikročestice nije znatno promijenilo s obzirom na početnu vrijednost. Temperatura staklišta za IVa mikročestice bila je  $67,7 \pm 2,2$  °C, a za IVb mikročestice  $67,2 \pm 1,3$  °C. Bez obzira na amorfnu prirodu uzorka, nije došlo do promjena strukture mikročestica. Nekada lijek dispergiran unutar polimernog matriksa djeluje kao antiplastifikator usporavajući procese relaksacije i fizičkog starenja amorfnih sustava (Rosilio i sur., 1998).

Nasuprot tim uzorcima, mikročestice IVc odlikuju se prominentnom separacijom faza pokazujući još izraženije odvojene termičke događaje na  $\sim 66$  i  $\sim 74$  °C u usporedbi s početnim stanjem (sl. 5 – 26. c).



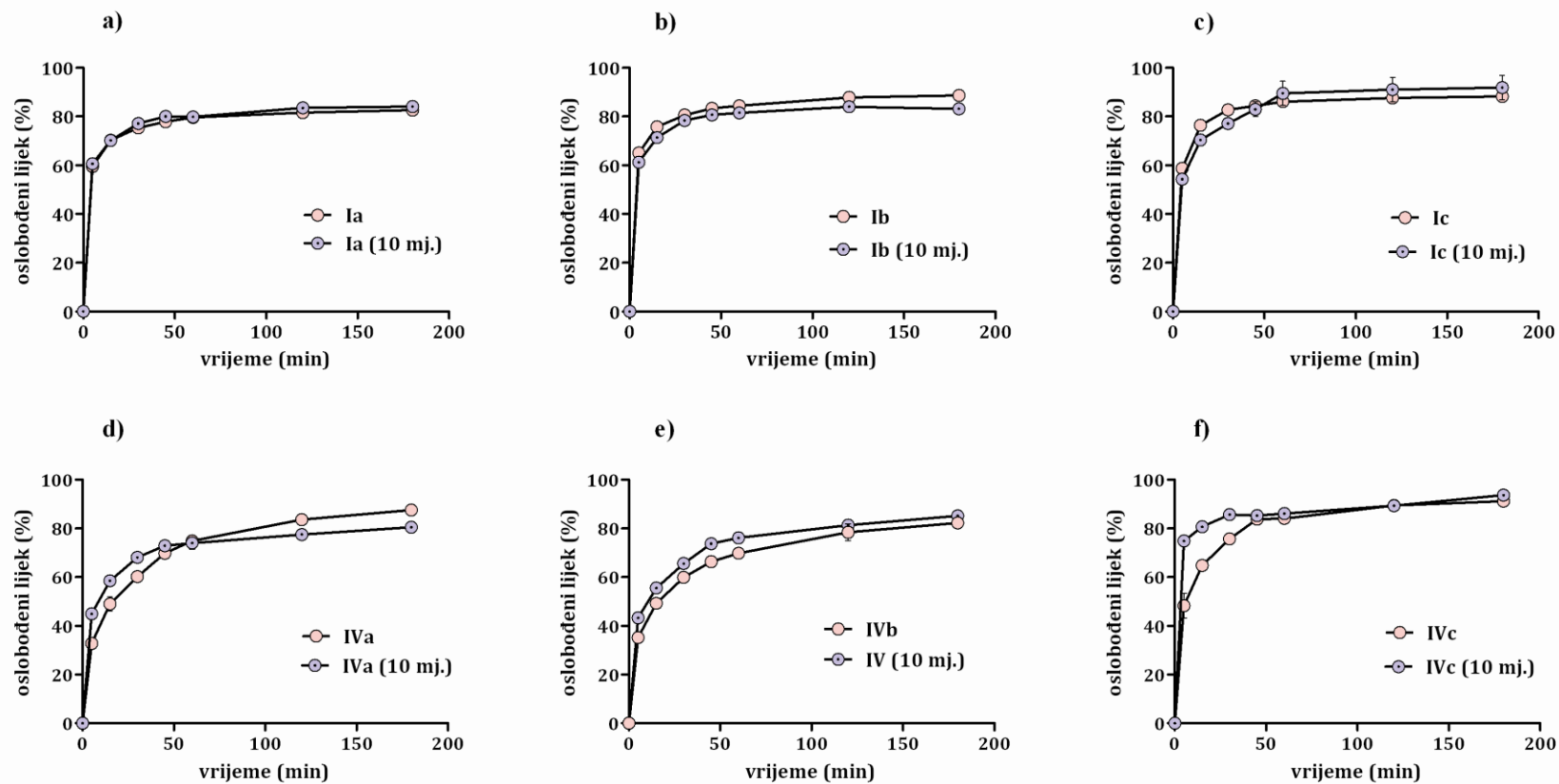
**Slika 5 – 26.** Krivulja reverzibilnog protoka topline za mikročestice uskladištene deset mjeseci na 25 °C/60%RV: a) Ia, Ib i Ic; b) IVa, IVb i IVc i c) povećana krivulja u području razdvajanja faza i pojave dvaju staklastih prijelaza za mikročestice IVc

### **5.5.3. In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica**

Na slici 5 – 27. prikazani su profili oslobađanja lijeka iz mikročestica s početka ispitivanja stabilnosti i nakon deset mjeseci uskladištenja. Grafički prikaz krivulja oslobađanja lijeka govori da se za veliku većinu mikročestica funkcionalnost mikročestica nije bitno promijenila tijekom starenja. Bitne promjene profila oslobađanja lijeka uočene su za mikročestice IVc, za koje je također primijećena prominenta separacija faza koja je dodatno ugrozila kontrolirano oslobađanje.

Usporedbom A i B parametara biekspnencijalne krivulje, koja najbolje opisuje dobivene profile oslobađanja, statistički je potvrđeno da među početnim i 10-mjesečnim profilima nema bitne razlike ( $P > 0,05$ ). Brze faze oslobađanja lijeka za mikročestice s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 ( $m/m$ ) kretale su se između  $50,3 \pm 5,2$  i  $57,6 \pm 7,0\%$ , uz konstante brzina koje su varirale između  $0,422 \pm 0,033$  i  $0,640 \pm 0,051 \text{ min}^{-1}$ . Količina brzo oslobođenog lijeka bila je između  $44,4 \pm 6,5$  i  $39,5 \pm 3,3\%$ , uz konstante brzine od  $0,423 \pm 0,036$  i  $0,552 \pm 0,033 \text{ min}^{-1}$  za mikročestice IVa i IVb. Te se vrijednosti nisu razlikovale od početnih. Međutim, mikročestice IVc imale su iznimno visoko početno oslobađanje (parametar A,  $76,6 \pm 1,8\%$ ), s konstantom brzine od  $0,505 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ . Vrijednosti parametara biekspnencijalne jednadžbe značajno se razlikuju od početno ostvarenih vrijednosti.

Zaključno, u većini uzoraka nije došlo do pojave kristalizacije niti separacije faza. Može se pretpostaviti da je polimerni matriks bio svojevrsna energetska barijera procesima koji su mogli narušiti funkcionalnost mikročestica. Manje promjene staklišta uzoraka s manjim udjelom lijeka nisu utjecale na promjenu načina oslobađanja lijeka. Promjene su bile uočljive samo pri većem udjelu lijeka u polimernom nosaču, a ovisno o upotrijebljenom otapalu.



**Slika 5 – 27.** *In vitro* oslobađanje lijeka iz mikročestica sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolne smjese (50 : 50, *m/m*) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60, *m/m*) nakon deset mjeseci uskladištenja na 25 °C/60%RV

**Tablica 5 – 19.** Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka iz mikročestica s omjerima lijeka i polimera 1 : 5 i 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50, *m/m*) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60, *m/m*) nakon 10-mjesečnog uskladištenja na 25 °C/60%RV

Mikročestice	Monoeksponecijalni model			Bieksponecijalni model				
	$Q = a(1 - e^{-kt})$			$Q = A(1 - e^{-k_1t}) + B(1 - e^{-k_2t})$				
	R <sup>2</sup>	a [% ± SEM]	k [min <sup>-1</sup> ± SEM]	R <sup>2</sup>	A [% ± SEM]	k <sub>1</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]	B [% ± SEM]	k <sub>2</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]
Ia <sup>(B)</sup>	0,975	79,6 ± 1,1	0,270 ± 0,027	0,994	50,3 ± 5,2	0,550 ± 0,038	23,4 ± 6,6	0,038 ± 0,010
Ib <sup>(B)</sup>	0,981	80,3 ± 1,0	0,271 ± 0,024	0,996	57,6 ± 7,0	0,640 ± 0,051	25,8 ± 8,1	0,051 ± 0,012
Ic <sup>(B)</sup>	0,939	85,8 ± 2,0	0,163 ± 0,025	0,974	54,7 ± 11,2	0,422 ± 0,033	37,6 ± 14,7	0,033 ± 0,013
IVa <sup>(B)</sup>	0,958	74,2 ± 1,4	0,143 ± 0,017	0,991	44,4 ± 6,5	0,423 ± 0,036	34,8 ± 8,3	0,036 ± 0,008
IVb <sup>(B)</sup>	0,942	77,6 ± 1,9	0,097 ± 0,014	0,997	39,5 ± 3,3	0,552 ± 0,033	44,6 ± 4,6	0,030 ± 0,003
IVc <sup>(B)</sup>	0,983	86,9 ± 1,0	0,389 ± 0,040	0,996	76,6 ± 1,8	0,505 ± 0,005	24,3 ± 18,1	0,030 ± 0,006

Legenda:

Q – postotak lijeka oslobođen u vremenu t; a – „plato“ vrijednost; k, k<sub>1</sub> i k<sub>2</sub> – konstante brzina; SEM – standardna pogreška; A i B – parametri koji predložuju udio lijeka oslobođenoga u brznoj i usporenoj fazi oslobađanja lijeka; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; <sup>(M),(B)</sup> – monoeksponecijalni ili bieksponecijalni model preferirani su matematički model (nakon usporedbe modela F-testom sume kvadrata)

## **5.6. Utjecaj fizičkog oblika polimera na svojstva mikročestica**



U prethodnim poglavljima opisana je priprava mikročestica iz otopina lijeka i polimera, pri čemu je očekivan i potvrđen nastanak čvrstih disperzija. Lijek je u tim sustavima amorfiziran, što je zasigurno pridonijelo njegovu bržem otapanju i oslobađanju. Kako bi se istražila mogućnost zadržavanja lijeka u kristalnom stanju, te njegovo oblaganje i uklapanje u polimer, pripremljeni su uzorci iz smjesa kristalnog lijeka s polimerom u otopljenome ili dispergiranom stanju te su potom sušeni raspršivanjem.

### 5.6.1. Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka

Iskorištenja procesa sušenja za uzorke dobivene iz smjesa s otopljenim polimerom (Eudragit® RS 12.5) nešto su veća (66 – 75%) od iskorištenja procesa za uzorke dobivene iz smjesa s vodenom koloidnom disperzijom polimera (Eudragit® RS 30D) (59 – 63%) (tabl. 5 - 20). Nasuprot tome, uklapanje lijeka za sve mikročestice bilo je manje od teoretskoga, vjerojatno zbog nehomogenih kapljica nastalih raspršivanjem i zbog gubitka dijela čestica u ciklonu.

**Tablica 5 – 20.** Svojstva mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*) (Id – Ie) i 2 : 1 (*m/m*) (IVd – IVe)

Mikročestice	Otapalo	Iskorištenje Procesa [%]	Sadržaj lijeka u mikročesticama [% ± SD]	Uspješnost uklapanja lijeka [% ± SD]
Id	aceton : izopropanol (40 : 60, <i>m/m</i> ) <sup>1</sup>	75,1	15,1 ± 0,1	95,9 ± 0,2
Ie	voda <sup>2</sup>	62,6	15,1 ± 0,0	95,6 ± 0,2
IVd	aceton : izopropanol (40 : 60, <i>m/m</i> ) <sup>1</sup>	66,2	54,1 ± 0,5	85,9 ± 0,7
IVe	voda <sup>2</sup>	59,4	60,5 ± 0,4	96,0 ± 0,6

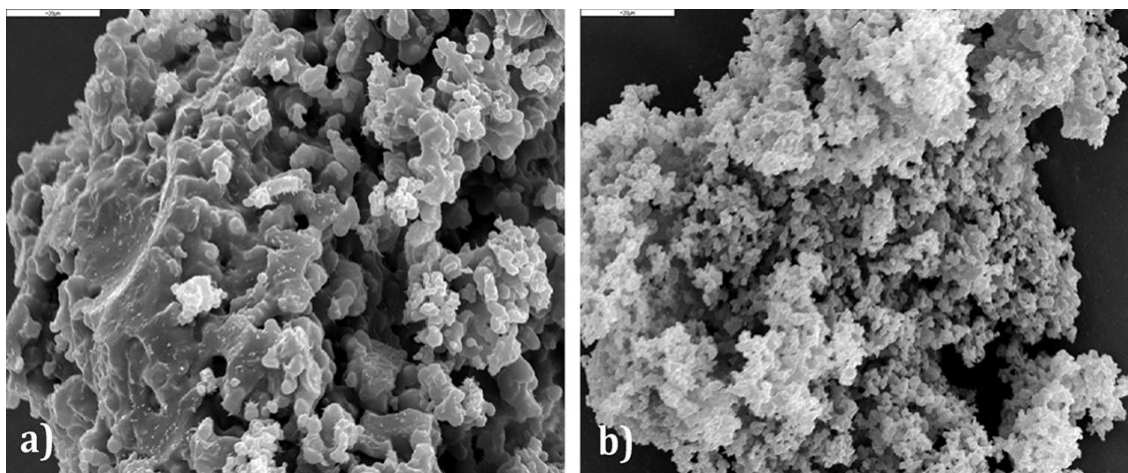
Legenda:

<sup>1</sup> – komercijalno dostupna otopina polimera Eudragit® 12.5 (aceton-izopropanol, 40 : 60, (*m/m*)); <sup>2</sup> – komercijalno dostupna vodena disperzija polimera Eudragit® 30D; iskorištenje procesa (%) – omjer mase dobivenih mikročestica i mase ukupnih sastojaka dodanih u otopinu za raspršivanje; uspješnost uklapanja lijeka (% *m/m*) – omjer stvarnoga i teoretskoga (dodanog) sadržaja mupirocin kalcija u mikročesticama; SD – standardna devijacija (n=3)

### 5.6.2. Morfologija mikročestica

Slika 5 – 28. prikazuje snimke mikročestica sušenih iz smjesa s različitim omjerima lijeka i polimera (1 : 5 i 2 : 1 ( $m/m$ )) u kojima je korišten otopljeni polimer (Eudragit® RS 12.5). Kao što je ustanovljeno, sušenjem nastaju veliki aglomerati slijepljenih mikročestica veći od 100  $\mu m$ . Postoji samo mali broj pojedinačnih nedeformiranih mikročestica. Vidljivo je da se pri primjeni otopljenog polimera (Eudragit® RS 12.5) ne stvaraju pravilno odijeljene mikročestice ni za jedan omjer lijeka i polimera.

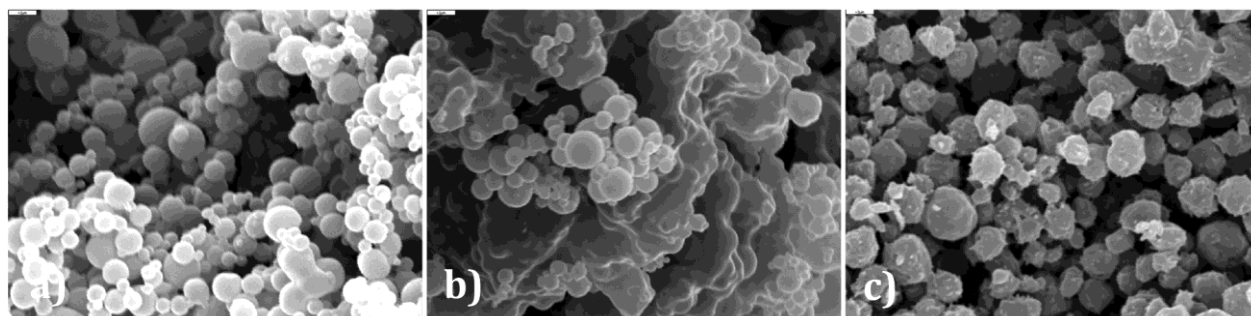
Tako veliki aglomerati objašnjavaju visoka iskorištenja procesa dobivena za uzorke Id i IVD. Veličina čestica bitno utječe na uspješnost separacije čestica iz vrtložnog sloja medija za sušenje tijekom prolaska kroz ciklon te je bolje iskorištenje rezultat veličine aglomerata.



**Slika 5 – 28.** SEM slike mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 ( $m/m$ ) (a) i 2 : 1 ( $m/m$ ) (b) sušenih raspršivanjem iz aceton-izopropanolske smjese (polimer u otopljenom stanju) (skala označava 20  $\mu m$ )

Na slici 5 – 29. vide se mikročestice nastale iz smjesa za raspršivanje u kojima je polimer bio u obliku vodene koloidne disperzije (Eudragit® RS 30D). Mikročestice s manjim udjelom lijeka (sl. 5 – 29. a – b) pokazuju dvije morfološke populacije: jednu građenu od pravilnih sfera i drugu koja je djelomično aglomerirana. Mikročestice s većim udjelom lijeka (koji ostaje djelomično neotopljen, tj. u kristalnome mikroniziranom obliku) imaju

izgled polimerom obloženih mikročestica (sl. 5 – 29. c). Vidljivo je da postoji razlika u nastanku mikročestica kad se uporabi otopljeni oblik polimera i kad se uporabi koloidna disperzija. Prema SEM slikama, oblaganje čestica bilo je izvedivo s koloidnim disperzijama, dok polimerne otopine nisu bile pogodne za te procese.



**Slika 5 – 29.** SEM slike mikročestica s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*) (a – b) i 2 : 1 (*m/m*) (c) sušenih raspršivanjem iz vodene smjese (polimer u disperznom stanju) (skala označava 2  $\mu\text{m}$ )

### 5.6.3. Veličina čestica

Volumna raspodjela veličine čestica prikazana je u tablici 5 – 21. samo za mikročestice dobivene iz vodenih koloidnih polimernih disperzija. Rezultati analiza za mikročestice Ie pokazuju da postoje aglomerati do 28  $\mu\text{m}$ , što je i vidljivo iz SEM slika. Mikročestice IVe velike su do 10-ak  $\mu\text{m}$ , što je također u skladu sa SEM slikama.

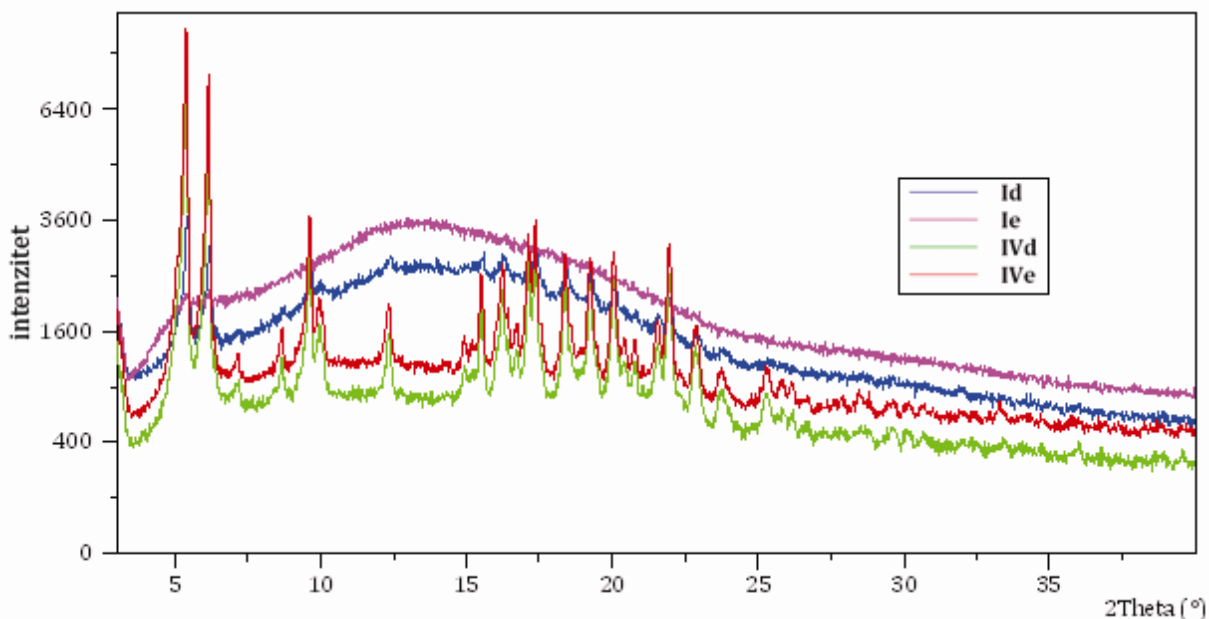
**Tablica 5 – 21.** Volumna raspodjela veličine čestica sušenih raspršivanjem iz smjese lijeka s vodenom koloidnom disperzijom polimera

Mikročestice	Raspodjela veličine čestica [ $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ]		
	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)
Ie	4,4 $\pm$ 0,1	12,1 $\pm$ 0,2	28,1 $\pm$ 0,6
IVe	3,6 $\pm$ 0,0	6,1 $\pm$ 0,0	10,6 $\pm$ 0,0

Legenda: d(0,1), d(0,5) i d(0,9) označavaju da je 10, 50 i 90% volumne raspodjele mikročestica ispod navedene vrijednosti; SD – standardna devijacija (n=6)

#### 5.6.4. Rendgenska difrakcija mikročestica

Difraktogrami mikročestica prikazani su na slici 5 – 30. Uzorci s većim udjelom lijeka IVd i IVe (mupirocin kalcij je u smjesi za raspršivanje uglavnom bio neotopljen) zadržale su kristalni oblik lijeka s karakterističnim difrakcijskim „pikovima“. Uzorci s manjim udjelom lijeka (jedan dio mupirocin kalcija u smjesi za raspršivanje bio je otopljen) pokazivali su znakove kristalne forme jer su se karakteristični difrakcijski „pikovi“ vidjeli na 5,4 i 6,2° (2θ), ali uzorak Ie imao je manje kristalnog lijeka od uzorka Id (što je objašnjivo manjom topljivošću lijeka u aceton-izopropanolskoj smjesi nego u vodi).

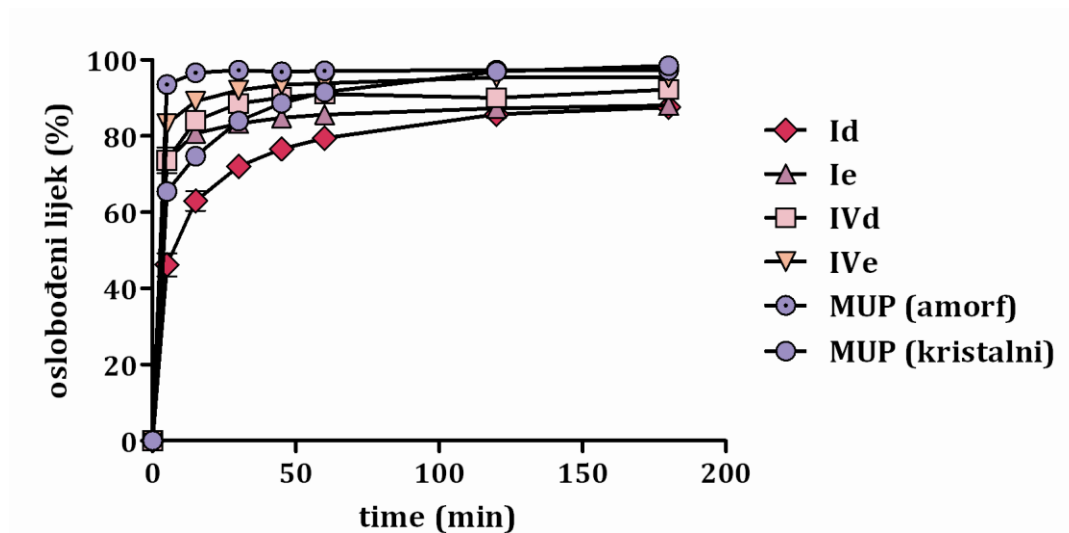


**Slika 5 – 30.** Difraktogram mikročestica s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 i 5 : 1 (m/m) sušenih raspršivanje iz smjesa različitih fizičkih oblika lijeka i polimera

#### 5.6.5. In vitro oslobađanje lijeka iz mikročestica

Na slici 5 – 31. prikazani su profili oslobađanja lijeka iz mikročestica Id – Ie i IVd – IVe. Vidljivo je da strategija korištenja djelomično otopljenog lijeka s različitim fizičkim oblicima polimera nije bitno unaprijedila kontrolu oslobađanja lijeka. Svi profili oslobađanja lijeka iz mikročestica bili su jednaki ili viši od profila otapanja kristalnog lijeka, osim mikročestica Id.

Međutim, iz prethodnih SEM slika (sl. 5 – 28. a) vidljivo je da su te mikročestice zapravo neprihvatljivo veliki aglomerati (ako se pretpostavi upotreba mikročestica na površini kože) te da je usporeno oslobađanje lijeka posljedica smanjenja površine kroz koju otapalo prodire do lijeka.



**Slika 5 – 31.** *In vitro* oslobađanje lijeka iz mikročestica s omjerom lijeka i polimer 1 : 5 i 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanje iz smjesa različitih fizičkih oblika lijeka i polimera

Parametri matematičkog modeliranja krivulja oslobađanja prikazani su u tablici 5 – 22. Vidljivo je da uzorak IVe ne odgovara bieksponecijalnom modelu kao ostale mikročestice za koje je najbolje slaganje ostvareno primjenom bieksponecijalnog modela. Brze faze oslobađanja lijeka za mikročestice s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*) kretale su se između  $52,8 \pm 3,0$  i  $77,4 \pm 1,8\%$ , uz konstante brzine koje su varirale između  $0,316 \pm 0,036$  i  $0,549 \pm 0,068 \text{ min}^{-1}$ . Kao što je vidljivo, mikročestice Id imale su najniži parametar A, koji označava najniže početno oslobađanje lijeka. Količina brzo oslobođenog lijeka bila je oko  $71,9 \pm 12,1\%$ , uz konstantu brzine od  $0,588 \pm 0,241 \text{ min}^{-1}$  za mikročestice IVd.

**Tablica 5 – 22.** Matematičko modeliranje oslobađanja lijeka iz mikročestica s omjerima lijeka i polimera 1 : 5 i 2 : 1 (*m/m*) sušenih raspršivanjem iz a) metanola; b) metanol-etanolske smjese (50 : 50, *m/m*) i c) aceton-izopropanolske smjese (40 : 60, *m/m*)

Mikročestice	Monoeksponencijalni model $Q = a(1 - e^{-kt})$			Bieksponencijalni model $Q = A(1 - e^{-k_1t}) + B(1 - e^{-k_2t})$				
	R <sup>2</sup>	a [% ± SEM]	k [min <sup>-1</sup> ± SEM]	R <sup>2</sup>	A [% ± SEM]	k <sub>1</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]	B [% ± SEM]	k <sub>2</sub> [min <sup>-1</sup> ± SEM]
Id <sup>(B)</sup>	0,959	80,3 ± 1,6	0,129 ± 0,016	0,997	52,8 ± 3,0	0,316 ± 0,036	34,8 ± 4,4	0,025 ± 0,004
Ie <sup>(B)</sup>	0,992	85,0 ± 0,6	0,399 ± 0,028	0,998	77,4 ± 1,8	0,549 ± 0,068	10,6 ± 2,9	0,026 ± 0,009
IVd <sup>(B)</sup>	0,992	89,5 ± 0,7	0,400 ± 0,022	0,997	71,9 ± 12,1	0,588 ± 0,241	19,2 ± 13,1	0,066 ± 0,030
IVe <sup>(M)</sup>	0,995	93,2 ± 0,5	0,443 ± 0,028	0,999	79,7 ± 1,4	†	15,2 ± 2,0	0,056 ± 0,010

Legenda:

Q – postotak lijeka oslobođen u vremenu t; a – „plato“ vrijednost; k, k<sub>1</sub> i k<sub>2</sub> – konstante brzina; SEM – standardna pogreška; A i B – parametri koji predložuju udio lijeka oslobođenoga u brznoj i usporenoj fazi oslobađanja lijeka; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; <sup>(M),(B)</sup> – monoeksponencijalni ili bieksponencijalni model preferirani su matematički model (nakon usporedbe modela F-testom sume kvadrata)

Zaključno, mikročestice IVd i IVe koje su sadržavale kristalni lijek nisu ostvarile kontrolirano oslobađanje lijeka, pogotovo u usporedbi sa samim kristalnim lijekom. Uzorci su morfološki bili bitno različiti, ali to nije imalo bitnijeg utjecaja na način oslobađanja lijeka. Međutim, slaba kontrola oslobađanja lijeka može se objasniti postojanjem polisorbata 80, koji je upotrijebljen za pripravu neaglomeriranih suspenzija lijeka u polimeru neposredno prije sušenja raspršivanjem. Surfaktant je možda omogućio bolje vlaženje mikročestica i ubrzano oslobađanje lijeka. Stoga se surfaktani u takvim sustavima moraju upotrebljavati s oprezom.

Iz rezultata je također vidljivo da je priprava čvrstih disperzija bolji pristup ostvarivanju kontroliranog oslobađanja lijeka u testiranim uzrocima. Oblaganje lijeka polimerom, bilo da se upotrebljava disperzija ili otopina lijeka, nije prikladno za kontrolirano oslobađanje lijeka. Dodatno, primjena polimernih otopina za oblaganje mikroniziranih čestica lijeka nije bila prikladna za stvaranje pravilnih mikročestica.

## **5.7. Antimikrobna djelotvornost mikročestica**



Cilj istraživanja antimikrobne djelotvornosti mikročestica bio je potvrditi način oslobađanja lijeka iz mikročestica te ispitati njegovu aktivnost nakon oslobađanja. S obzirom na to da su testiranja *in vitro* oslobađanja provedena u medijima koji su sadržavali mnogo veću količinu otapala nego što se fiziološki može očekivati tijekom topičke primjene, ovakav način ispitivanja funkcionalnosti mikročestica trebao je biti sličniji ciljanoj namjeni. Odabrane su kulture mikroorganizama za koje je prethodno potvrđeno da su osjetljive na mupirocin kalcija.

### 5.7.1. Djelotvornost lijeka nakon oslobađanja iz mikročestica

Antimikrobna djelotvornost mikročestica uspoređena je s djelotvornošću samog lijeka, praznih mikročestica te lijeka oslobođenoga iz mikročestica (nakon tri sata *in vitro* oslobađanja lijeka). Za te su analize odabrane mikročestice IV i IV-110 zbog najprikladnijih rezultata *in vitro* testiranja koji su upućivali na to da ti sustavi najbolje kontroliraju oslobađanje lijeka. Kao što je i očekivano, prazne mikročestice (izrađene samo od polimera) nisu pokazale nikakvu antimikrobnu djelotvornost. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za sve je analizirane uzorke nakon 18 sati bila 0,125 µg/ml. Minimalne baktericidne koncentracije (MBK) (tabl. 5 – 23) svih uzoraka bile su ovisne o koncentraciji primijenjenog lijeka i vremenu djelovanja i pokazivale su nisku baktericidnu aktivnost.

**Tablica 5 – 23.** Minimalne baktericidne koncentracije (MBK) mupirocin kalcija i mikročestica testiranih na kulturi *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) (n=3)

Uzorak	MBK nakon 3 sata [µg/ml]	MBK nakon 6 sati [µg/ml]	MBK nakon 18 sati [µg/ml]
mupirocin kalcij	128	32	16
IV	128 – 256	64 – 128	16
IV-110	128 – 256	64 – 128	16
IV (lijeak oslobođen iz mikročestica)	128	32	16
IV-110 (lijeak oslobođen iz mikročestica)	128	32	16

Minimalna inhibitorna koncentracija bila je znatno niža od koncentracije potrebne da ubije 99% mikroorganizama u usporedbi s početnim inokulumom nakon 18 sati inkubacije, što je u skladu s prethodno opisanim baktericidnim svojstvima mupirocina (Sutherland i sur., 1985). Nakon tri i šest sati inkubacije minimalne baktericidne koncentracije bile su dva puta veće za mikročestice nego za sam lijek ili lijek oslobođen nakon tri sata *in vitro* oslobađanja (tabl. 5 – 23). Više MBK vrijednosti potječu od sporijeg oslobađanja lijeka iz mikročestice, što je u skladu s analizama *in vitro* oslobađanja lijeka i željenog djelovanja mikročestičnog sustava. Nakon 18 sati inkubacije minimalne baktericidne koncentracije bile su slične za sve analizirane uzorke s lijekom. Provedene analize potvrđuju da je lijek oslobođen iz mikročestica zadržao svoju antimikrobnu djelotvornost, kao i da lijek iz mikročestica izlazi usporeno.

### **5.7.2. Dinamika uginuća bakterija djelovanjem lijeka u vremenu**

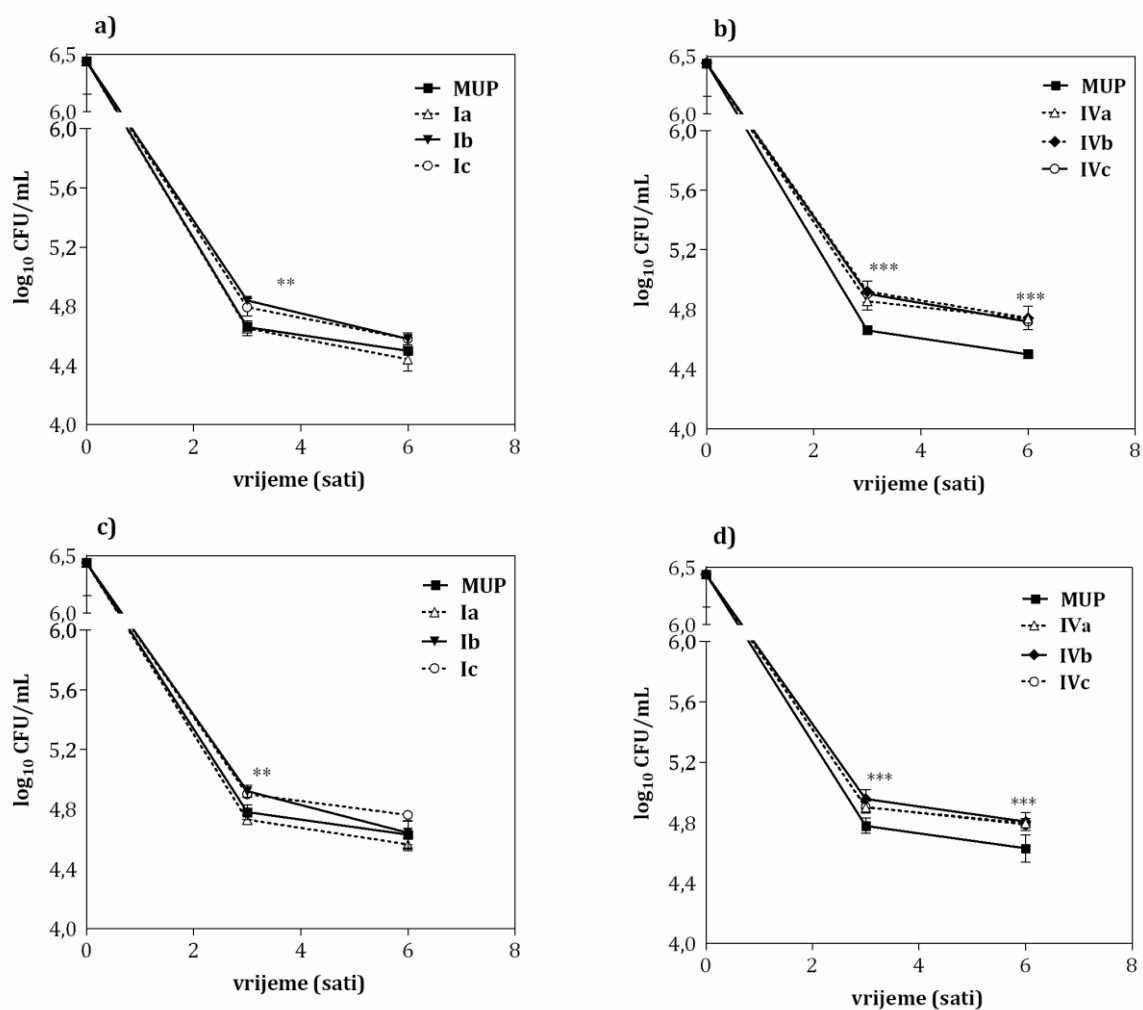
Rezultati testiranja dinamike uginuća bakterija u vremenu djelovanjem lijeka iz mikročestica i slobodnog lijeka grafički su prikazani na slikama 5 – 32. i 5 – 33. Minimalna inhibitorna koncentracija za sve je analizirane uzorke *S. aureus* (ATCC 29213) nakon 24 sata inkubacije bila 0,125 µg/ml . Minimalna inhibitorna koncentracija za *S. aureus* (meticilin-rezistentni *S. aureus* ili MRSA soj) bila je između 0,25 i 0,5 µg/ml, pa se prema postojećoj literaturi smatralo da je soj osjetljiv na primijenjeni antibiotik (Kresken i sur., 2004).

Nakon tri sata inkubacije lijeka i Ia mikročestica u koncentracijama od 8 i 16 µg/ml pad broja kolonija za oba je testirana soja *S. aureusa* bio sličan (točnije iznosio je 4,7-4,9 log cfu/ml i 4,6-4,7 log cfu/ml). Mikročestice Ib i Ic znatno su se razlikovale od samog lijeka, što je rezultiralo smanjenjem broja naraslih kolonija na 4,8-4,9 log cfu/ml za ATCC 29213 i na 4,8–5,0 log cfu/ml za MRSA soj. Međutim, nakon šest sati inkubacije za obje testirane koncentracije nije bilo znatne razlike u antimikrobnoj djelotvornosti između mikročestica i lijeka, što se može pripisati potpunom oslobađanju lijeka iz mikročestica u tom vremenu.

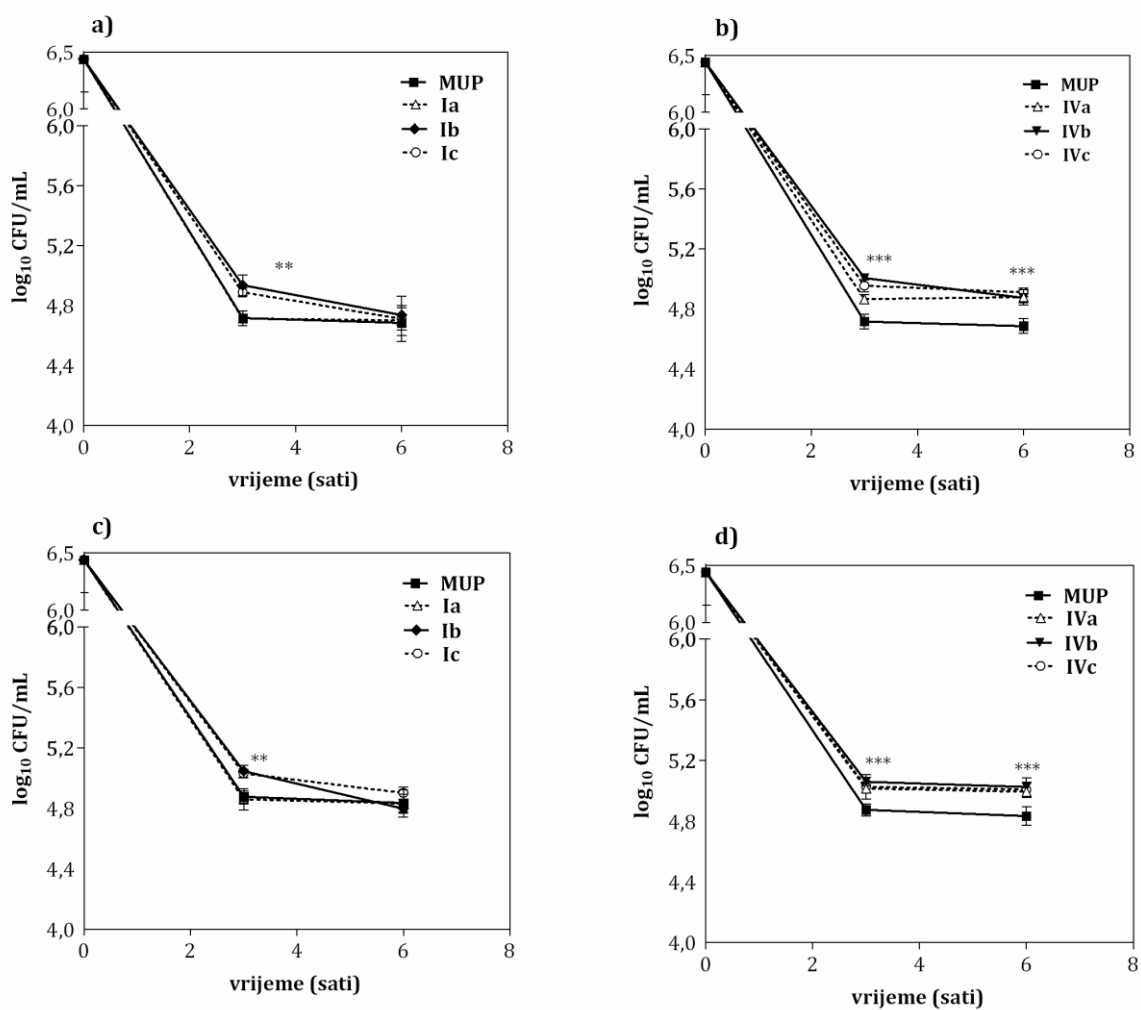
Mikročestice (IVa, IVb, IVc) s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 (*m/m*) bile su statistički značajno ( $P < 0,05$ ) manje aktivne nego lijek nakon tri i šest sati inkubacije. Broj kolonija *S. aureus* (ATCC 29213) koje su bile izložene koncentracijama od 16 µg/ml i 8 µg/ml nakon 24

sata pao je na približno 3,9 log cfu/ml i 4,2 log cfu/ml, što je odgovaralo 99,7-postotnom i 99,3-postotnom smanjenju početnog inokuluma. Broj kolonija MRSA pao je na 4,3 log cfu/ml (99,3-postotno smanjenje inokuluma) i na 4,5 cfu/ml (99-postotno smanjenje inokuluma) za 16 µg/ml i 8 µg/ml primijenjenu koncentraciju. Nakon 24 sata inkubacije svi su analizirani uzorci pokazivali sličnu djelotvornost,. Ti rezultati antimikrobne djelotvornosti mikročestica dobro koreliraju s rezultatima *in vitro* oslobađanja lijeka, pokazujući da se iz mikročestica s povećanim udjelom lijeka ostvaruje mnogo sporije oslobađanje lijeka u usporedbi sa samim lijekom i mikročesticama s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*).

Unatoč vrlo visokoj primijenjenoj baktericidnoj koncentraciji lijeka, ovaj je test bio dovoljno osjetljiv da detektira razlike između lijeka i mikročestica, dajući snažne dokaze o sposobnosti mikročestica da uspore oslobađanja lijeka. Primjena takvog sustava u terapiji, naravno, zahtijeva prilagodbu količine početno apliciranih mikročestica potrebnih da se npr. na površini kože održi učinkovita koncentracija lijeka.



**Slika 5 – 32.** Dinamika uginuća sojeva *S. aureus* ATCC 29213 u vremenu izloženih mupirocinu kalciju i mikročesticama u koncentracijama od 16 µg/ml (a,b) i 8 µg/ml (c,d) nakon tri i šest sati. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između mikročestica i lijeka



**Slika 5 – 33.** Dinamika uginuća sojeva *S. aureus* MRSA u vremenu izloženih mupirocin kalciju i mikročesticama u koncentracijama od 16 µg/ml (a,b) i 8 µg/ml (c,d) nakon tri i šest sati. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između mikročestica i lijeka.

## 6. ZAKLJUČCI

**Omjer lijeka i polimera** bitno je utjecao na kinetiku oslobađanja lijeka iz mikročestica te na njihovu morfologiju. Neočekivano, najbolje kontrolirano oslobađanje ostvareno je za uzorke s omjerom lijeka i polimera 2 : 1 ( $m/m$ ). Ostali ispitivani omjeri lijeka i polimera (1 : 5, 1 : 2, 1 : 1, 5 : 1,  $m/m$ ) pokazali su lošiju kontrolu oslobađanja lijeka, vjerojatno zbog brzog očvršćivanja polimera koji uvjetuje nastanak mikromatriksa niske gustoće. Morfologija mikročestica bila je izravno povezana sa stupnjem zasićenosti lijeka i polimera u otapalu primijenjenom za pripravu otopine za raspršivanje. Kada je zasićenost neke od komponenti bila visoka, zbog ranog očvršćivanja mikrokapljica nastajale su deformirane mikročestice. Uspješnost uklapanja lijeka unutar mikročestica, kao i iskorištenje procesa nisu bitno ovisili o omjeru lijeka i polimera. Karakterizacija čvrstog stanja mikročestica pokazala je da tijekom procesa raspršivanja uglavnom nastaju amorfne čvrste otopine, osim za mikročestice s najvećim udjelom lijeka (omjer lijeka i polimera 5 : 1 ( $m/m$ )). Te su mikročestice nehomogene čvrste disperzije amorfnog lijeka u amorfnom polimeru. Između lijeka i polimera nije bilo jačih interakcija koje bi utjecale na način oslobađanja lijeka.

**Ulazna temperatura** sušenja bitno je utjecala na početno oslobađanje lijeka (ali i na ukupni profil), i to tako da je viša ulazna temperatura pogodovala sniženju početnog oslobađanja lijeka. Temperatura je utjecala na svojstva polimernog matriksa omogućujući bolju gibljivost polimernih lanaca iznad temperature staklišta te uzrokujući relaksacijske procese koji dovode do smanjenja slobodnog volumena i povećanja gustoće. Povezano s tim, uočen je trend porasta staklišta mikročestica s porastom ulazne temperature. Dodatno, snižene vrijednosti ostatnih otapala umanjile su plastifikacijski učinak otapala. Takva svojstva matriksa utječu na ometanje ulaska medija u mikročesticu te usporavaju oslobađanje lijeka. Duljina difuzijskog puta u mikročestičnim sustavima drastično je smanjena u usporedbi s makroskopskim terapijskim sustavima. Stoga je svaka devijacija u oblikovanju polimernog matriksa izvor povećanoga početnog oslobađanja lijeka. Ulazna temperatura nije imala znatnijeg utjecaja na iskorištenje procesa, morfologiju i veličinu čestica. Sve su mikročestice bile amorfne čvrste otopine, bez jakih interakcija između lijeka i polimera.

**Koncentracija otopine za raspršivanje** utjecala je na način oslobađanja lijeka, veličinu i morfologiju mikročestica te na iskorištenje procesa. Povećanje koncentracije otopine za raspršivanje iznad 4% ( $m/m$ ) uvjetovalo je narušavanje kontrole oslobađanja lijeka, dok je za koncentracije niže od 4% ( $m/m$ ) ostvarena dobra kontrola oslobađanja lijeka. Rano taloženje komponenti zbog visoke početne zasićenosti lijeka i polimera onemogućivalo je sažimanje/smanjivanje mikrokapljice i povećanje njezine gustoće. Mikrokapljice su brzo „smrznute“ te su polimerni lanci ostali „labavo“ pakirani, što je rezultiralo brzim nekontroliranim otpuštanjem lijeka. Mikročestice dobivene iz koncentriranijih otopina bile su sferične i veće, a one iz razrijeđenih otopina – deformirane i manje. Iskorištenje procesa raslo je s povećanjem koncentracije otopine za raspršivanje. Koncentracija otopine za sušenje nije bitno utjecala na svojstva čvrstog stanja mikročestica.

**Otapala** uporabljena za dobivanje mikročestica utjecala su na termička svojstva amorfni čvrstih disperzija (a ovisno i o omjeru lijeka i polimera) te na morfologiju i način oslobađanja lijeka iz mikročestica. Mješivost lijeka i polimera bila je određena otapalom, uz stalan sastav i procesne uvjete sušenja raspršivanjem. Razlozi su različite kinetike očvršćivanja lijeka i polimera prouzročene različitim topljivostima u odabranim otapalima. Očito je da je jedan od preduvjeta istodobnog očvršćivanja polimera i ostvarivanja (kinetičke) mješivosti i lijeka njihova približno jednaka topljivost u zajedničkom otapalu. Bolja topljivost i lijeka i polimera u otapalu pogodovala je nastanku sferičnih mikročestica, dok su visoke zasićenosti bilo koje od komponenti uvjetovale promjenu pravilne sferične morfologije. Otapala su utjecala na način i brzinu nastanka mikročestica te na način oslobađanja lijeka. Općenito, što su polimer i lijek topljiviji u otapalu, teže će doći do separacije faza i nastanka nehomogenih čvrstih disperzija koje mogu ugroziti kontrolirano oslobađanje lijeka. Otapalo nije utjecalo na uspješnost uklapanja lijeka u mikročestice te na iskorištenje procesa.

Mikročestice (u obliku čvrstih disperzija) dobivene iz različitih otapala bile su **fizički stabilne** tijekom deset mjeseci skladištenja na 25 °C/60%RV, bez znatnih promjena u načinu oslobađanja lijeka i obilježjima čvrstog stanja.

Mikročestice pripravljene oblaganjem mikroniziranog lijeka **otopinom ili disperzijom polimera** nisu pokazale kontrolirano oslobađanje lijeka. Dodatno, primjena



polimernih otopina pri oblaganju mikroniziranih čestica lijeka nije pogodovala nastanku pravilnih mikročestica.

**Antimikrobna djelotvornost lijeka** oslobođenoga iz mikročestica pokazala je da je lijek sačuvao svoju aktivnost i nakon procesa mikrokapsuliranja. Također, usporeno oslobađanje lijeka potvrđeno je studijama dinamike uginuća na sojevima *S. Aureus* (ATCC 29213) i meticilin-rezistentnim sojevima *S. aureus* (MRSA). Ti rezultati dobro koreliraju s rezultatima *in vitro* oslobađanja lijeka, dokazujući da je, za mikročestice s povećanim udjelom lijeka, oslobađanje lijeka iz mikrosustava znatno sporije u usporedbi sa samim lijekom i mikročesticama s omjerom lijeka i polimera 1 : 5 (*m/m*).

Općenito, morfologija mikročestica bila je primarno određena početnim zasićenjem lijeka ili polimera u otopini za raspršivanje. Zasićenost je parametar koji upravlja početkom očvršćivanja tijekom procesa sušenja kapljice. Promjenom omjera lijeka i polimera ili sustava otapala primijećene su najveće promjene morfologije mikročestica. Potpuno uklapanje lijeka postignuto je u svim uzorcima pripremljenima iz otopina lijeka i polimera. Homogenost otopine zadržava se u mikrokapljici te je i unutar mikročestice očuvan omjer lijeka i polimera. Međutim, zbog difuzijskih procesa ili površinske aktivnosti moguća je preraspodjela lijeka i polimera unutar mikročestice. Procesom sušenja raspršivanjem iz otopine mupirocin kalcija i poli(meta)krilnog polimera nastaju staklaste čvrste disperzije. Ovisno o omjeru lijeka i polimera, one su ili molekulske disperzije lijeka u polimeru ili kombinacije molekulske disperzije i amorfnih nakupina lijeka. Staklaste čvrste disperzije s izdvojenom amorfnom fazom lijeka nastaju i primjenom otapala koje bitno smanjuje topljivost lijeka te je početna zasićenost ekstremno visoka. Tijekom sušenja najprije se taloži lijek iz otopine, što uvjetuje razdvajanje faza lijeka i polimera (smanjenja njihove mješivosti). Kontrolirano oslobađanje lijeka postignuto je samo iz staklastih čvrstih disperzija molekulski dispergiranog lijeka u polimeru, uz preduvjet da je polimerni matriks nastao kasnije u procesu sušenja, nakon dovoljnog sažimanja kapljice i stvaranja gušćega polimernog matriksa.

## LITERATURA

- Abell, A. B., Willis, K. L. i Lange, D. A. (1999). Mercury Intrusion Porosimetry and Image Analysis of Cement-Based Materials. *J Colloid Interface Sci*, 211, 39-44.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N. i Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*, 100, 5-28.
- Ågren, J. (2002). On the classification of phase transformations. *Scripta Materialia*, 46, 893-898.
- Al-Obaidi, H., Brocchini, S. i Buckton, G. (2009). Anomalous properties of spray dried solid dispersions. *J Pharm Sci*, 98, 4724-4737.
- Al-Zoubi, N., Alkhatib, H. S., Bustanji, Y., Aiedeh, K. i Malamataris, S. (2008). Sustained-release of buspirone HCl by co spray-drying with aqueous polymeric dispersions. *Eur J Pharm Biopharm*, 69, 735-742.
- Allemann, E., Leroux, J. i Gurny, R. (1998). Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 171-189.
- Allison, S. D. (2008). Effect of structural relaxation on the preparation and drug release behavior of poly(lactic-co-glycolic) acid microparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci*, 97, 2022-2035.
- Amrutiya, N., Bajaj, A. i Madan, M. (2009). Development of microsponges for topical delivery of mupirocin. *AAPS PharmSciTech*, 10, 402-409.
- Angell, C. A. (1995). Formation of glasses from liquids and biopolymers. *Science*, 267, 1924-1935.
- Azarmi, S., Farid, J., Nokhodchi, A., Bahari-Saravi, S. M. i Valizadeh, H. (2002). Thermal treating as a tool for sustained release of indomethacin from Eudragit RS and RL matrices. *Int J Pharm*, 246, 171-177.
- Azarmi, S., Roa, W. H. i Lobenberg, R. (2008). Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 863-875.
- Bain, D. F., Munday, D. L. i Smith, A. (1999). Solvent influence on spray-dried biodegradable microspheres. *J Microencapsul*, 16, 453-474.
- Baines, P. J., Jackson, D., Mellows, G., Swaisland, A. M. i Tasker, T. C. G. (1984). Mupirocin: Its chemistry and metabolism. In: Wilkinson JD and Price JD, eds. Mupirocin - a novel topical antibiotic. *Royal Society of Medicine, London*, 13-22.
- Batrakova, E. V. i Kabanov, A. V. (2008). Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release*, 130, 98-106.
- Beck, R. C., Pohlmann, A. R., Hoffmeister, C., Gallas, M. R., Collnot, E., Schaefer, U. F., Guterres, S. S. i Lehr, C. M. (2007). Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm*, 67, 18-30.
- Bhattacharya, S. i Suryanarayanan, R. (2009). Local mobility in amorphous pharmaceuticals--characterization and implications on stability. *J Pharm Sci*, 98, 2935-2953.

- Bouissou, C., Rouse, J. J., Price, R. i Van Der Walle, C. F. (2006). The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res*, 23, 1295-1305.
- Bryskier, A. (2005). Mupirocin. In *ASM Press (Eds) Antimicrobial agents - antimicrobials and antifungals*, 964-975.
- Cal, K. i Sollohub, K. (2010). Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *J Pharm Sci*, 99, 575-586.
- Chen, R., Okamoto, H. i Danjo, K. (2008). Preparation of functional composite particles of salbutamol sulfate using a 4-fluid nozzle spray-drying technique. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 56, 254-259.
- Chiou, W. L. i Riegelman, S. (1971). Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J Pharm Sci*, 60, 1281-1302.
- Chow, A. H., Tong, H. H., Chattopadhyay, P. i Shekunov, B. Y. (2007). Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharm Res*, 24, 411-437.
- Chowdary, K. P. i Rao, Y. S. (2004). Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*, 27, 1717-1724.
- Coleman, J. N. i Craig, D. Q. M. (1996). Modulated temperature differential scanning calorimetry: a novel approach to pharmaceutical thermal analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 135, 13-29.
- Cortesi, R., Ajanji, S. C., Sivieri, E., Manservigi, M., Fundueanu, G., Menegatti, E. i Esposito, E. (2007). Eudragit microparticles as a possible tool for ophthalmic administration of acyclovir. *J Microencapsul*, 24, 445-456.
- Craig, D. Q., Royall, P. G., Kett, V. L. i Hopton, M. L. (1999). The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. *Int J Pharm*, 179, 179-207.
- Cruz, L., Soares, L. U., Costa, T. D., Mezzalana, G., Da Silveira, N. P., Guterres, S. S. i Pohlmann, A. R. (2006). Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int J Pharm*, 313, 198-205.
- Dahlberg, C., Millqvist-Fureby, A. i Schuleit, M. (2008). Surface composition and contact angle relationships for differently prepared solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm*, 70, 478-485.
- Dahlberg, C., Millqvist-Fureby, A., Schuleit, M. i Furo, I. (2010). Polymer-drug interactions and wetting of solid dispersions. *Eur J Pharm Sci*, 39, 125-133.
- Dellamary, L. A., Tarara, T. E., Smith, D. J., Woelk, C. H., Adrastas, A., Costello, M. L., Gill, H. i Weers, J. G. (2000). Hollow porous particles in metered dose inhalers. *Pharm Res*, 17, 168-174.
- Dillen, K., Vandervoort, J., Van Den Mooter, G. i Ludwig, A. (2006). Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*, 314, 72-82.
- Elversson, J. i Millqvist-Fureby, A. (2005a). Aqueous two-phase systems as a formulation concept for spray-dried protein. *Int J Pharm*, 294, 73-87.
- Elversson, J. i Millqvist-Fureby, A. (2005b). Particle size and density in spray drying-effects of carbohydrate properties. *J Pharm Sci*, 94, 2049-2060.

- Elversson, J. i Millqvist-Fureby, A. (2006). In situ coating--an approach for particle modification and encapsulation of proteins during spray-drying. *Int J Pharm*, 323, 52-63.
- Elversson, J., Millqvist-Fureby, A., Alderborn, G. i Elofsson, U. (2003). Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying. *J Pharm Sci*, 92, 900-910.
- Embil, K. i Nacht, S. (1996). The Microsponge Delivery System (MDS): a topical delivery system with reduced irritancy incorporating multiple triggering mechanisms for the release of actives. *J Microencapsul*, 13, 575-588.
- Esposito, E., Cervellati, F., Menegatti, E., Nastruzzi, C. i Cortesi, R. (2002). Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *Int J Pharm*, 242, 329-334.
- Esposito, E., Roncarati, R., Cortesi, R., Cervellati, F. i Nastruzzi, C. (2000). Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharm Dev Technol*, 5, 267-278.
- Filipović-Grčić, J., Perissutti, B., Moneghini, M., Voinovich, D., Martinac, A. i Jalšenjak, I. (2003). Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterisation. *J Pharm Pharmacol*, 55, 921-931.
- Filipović, I. i Lipanović, S. (1985) *Opća i anorganska kemija*, Zagreb, Školska knjiga.
- Freiberg, S. i Zhu, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm*, 282, 1-18.
- Fu, Y. J., Mi, F. L., Wong, T. B. i Shyu, S. S. (2001). Characteristic and controlled release of anticancer drug loaded poly (D,L-lactide) microparticles prepared by spray drying technique. *J Microencapsul*, 18, 733-747.
- Gander, B., Wehrli, E., Alder, R. i Merkle, H. P. (1995). Quality improvement of spray-dried, protein-loaded D,L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection. *J Microencapsul*, 12, 83-97.
- Gordon, M. i Taylor, J. S. (1952). Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers. *J Appl Chem*, 2, 493-500.
- Hadinoto, K. (2009). Mechanical stability of hollow spherical nano-aggregates as ultrasound contrast agent. *Int J Pharm*, 374, 153-161.
- Hadinoto, K. i Cheow, W. S. (2009). Hollow spherical nanoparticulate aggregates as potential ultrasound contrast agent: shell thickness characterization. *Drug Dev Ind Pharm*, 35, 1167-1179.
- Hadinoto, K., Phanapavudhikul, P., Kewu, Z. i Tan, R. B. (2007a). Dry powder aerosol delivery of large hollow nanoparticulate aggregates as prospective carriers of nanoparticulate drugs: effects of phospholipids. *Int J Pharm*, 333, 187-198.
- Hadinoto, K., Zhu, K. i Tan, R. B. (2007b). Drug release study of large hollow nanoparticulate aggregates carrier particles for pulmonary delivery. *Int J Pharm*, 341, 195-206.
- Hafner, A., Lovric, J., Voinovich, D. i Filipovic-Grcic, J. (2009). Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 381, 205-213.
- Hancock, B. C. i Zografi, G. (1997). Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci*, 86, 1-12.

- Hegazy, N., Demirel, M. i Yazan, Y. (2002). Preparation and in vitro evaluation of pyridostigmine bromide microparticles. *Int J Pharm*, 242, 171-174.
- Hilden, L. R. i Morris, K. R. (2004). Physics of amorphous solids. *J Pharm Sci*, 93, 3-12.
- Hill, V. L., Craig, D. Q. i Feely, L. C. (1999). The effects of experimental parameters and calibration on MTDSC data. *Int J Pharm*, 192, 21-32.
- Hughes, G. A. (2005). Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomed*, 1, 22-30.
- Jalšenjak, I., Jalšenjak, V. i Filipović-Grčić, J. (1998) *Farmaceutika*, Zagreb, Školska knjiga d.d.
- Janović, Z. (1997) Struktura i svojstva. IN JANOVIĆ, Z. (Ed.) *Polimerizacije i polimeri*. Zagreb, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu - Manualia Universitatis studiorum Zagrebiensis).
- Janssens, S., De Armas, H. N., Roberts, C. J. i Van Den Mooter, G. (2008a). Characterization of ternary solid dispersions of itraconazole, PEG 6000, and HPMC 2910 E5. *J Pharm Sci*, 97, 2110-2120.
- Janssens, S., De Zeure, A., Paudel, A., Van Humbeeck, J., Rombaut, P. i Van Den Mooter, G. (2010). Influence of preparation methods on solid state supersaturation of amorphous solid dispersions: a case study with itraconazole and eudragit e100. *Pharm Res*, 27, 775-785.
- Janssens, S., Roberts, C., Smith, E. F. i Van Den Mooter, G. (2008b). Physical stability of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethyleneglycol 6000/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends. *Int J Pharm*, 355, 100-107.
- Janssens, S. i Van Den Mooter, G. (2009). Review: physical chemistry of solid dispersions. *J Pharm Pharmacol*, 61, 1571-1586.
- Jiang, W., Gupta, R. K., Deshpande, M. C. i Schwendeman, S. P. (2005). Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 391-410.
- Jilek, S., Merkle, H. P. i Walter, E. (2005). DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 377-390.
- Kawakami, K., Sumitani, C., Yoshihashi, Y., Yonemochi, E. i Terada, K. (2010). Investigation of the dynamic process during spray-drying to improve aerodynamic performance of inhalation particles. *Int J Pharm*, 390, 250-259.
- Kim, E. H.-J., X., D. C. i D., P. (2003). On the mechanisms of surface formation and the surface compositions of industrial milk powders. *Drying Technol*, 21, 265-278.
- Ko, J. A., Park, H. J., Hwang, S. J., Park, J. B. i Lee, J. S. (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int J Pharm*, 249, 165-174.
- Kresken, M., Hafner, D., Schmitz, F. J. i Wichelhaus, T. A. (2004). Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. *Int J Antimicrob Agents*, 23, 577-581.
- Kristmundsdóttir, T., Gudmundsson, Ó. S. i Ingvarsdóttir, K. (1996). Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying. *Int J Pharm*, 137, 159-165.
- Landström, G., Alsins, J. i Bergenstahl, B. (2000). Competitive protein adsorption between serum albumin and  $\beta$ -lactoglobulin during spray-drying. *Food Hydrocolloids*, 14, 75-82.

- Landström, K., Arnebrant, T., Alsins, J. i Bergenståhl, B. (2003). Competitive protein adsorption between  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin during spray-drying: effect of calcium induced association *Food Hydrocolloids*, 17, 103-116.
- Langer, R., Cleland, J. L. i Hanes, J. (1997). New advances in microsphere-based single-dose vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 28, 97-119.
- Lawrence, C. M., Mackenzie, T., Pagano, K., J.C., T., Prince, W. T., Thawley, A. R. i Lanham, E. M. (1989). Systemic absorption of mupirocin after topical application of mupirocin ointment to healthy and dermatologically diseased skin. *Journal of Dermatological Treatment*, 1, 83-86.
- Lechuga-Ballesteros, D., Charan, C., Stults, C. L., Stevenson, C. L., Miller, D. P., Vehring, R., Tep, V. i Kuo, M. C. (2008). Trileucine improves aerosol performance and stability of spray-dried powders for inhalation. *J Pharm Sci*, 97, 287-302.
- Li, M., Rouaud, O. i Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm*, 363, 26-39.
- Lionzo, M. I., Re, M. I., Guterres, S. S. i Pohlmann, A. R. (2007). Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(epsilon-caprolactone) blends to control the release of a drug model. *J Microencapsul*, 24, 175-186.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C. i Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 1650-1662.
- Luna-Barcenas, G., Meredith, J. C., Sanchez, I. C. i Johnston, K. P. (1997). Relationship between polymer chain conformation and phase boundaries in a supercritical fluid. *J. Chem. Phys.*, 107, 10782-10792.
- Maa, Y. F., Nguyen, P. A. i Hsu, S. W. (1998). Spray-drying of air-liquid interface sensitive recombinant human growth hormone. *J Pharm Sci*, 87, 152-159.
- Maltesen, M. J., Bjerregaard, S., Hovgaard, L., Havelund, S. i Van De Weert, M. (2008). Quality by design - Spray drying of insulin intended for inhalation. *Eur J Pharm Biopharm*, 70, 828-838.
- Mandal, T. K., Bostanian, L. A., Graves, R. A., Chapman, S. R. i Idodo, T. U. (2001). Porous biodegradable microparticles for delivery of pentamidine. *Eur J Pharm Biopharm*, 52, 91-96.
- Martinac, A., Filipovic-Grcic, J., Perissutti, B., Voinovich, D. i Pavelic, Z. (2005a). Spray-dried chitosan/ethylcellulose microspheres for nasal drug delivery: swelling study and evaluation of in vitro drug release properties. *J Microencapsul*, 22, 549-561.
- Martinac, A., Filipovic-Grcic, J., Voinovich, D., Perissutti, B. i Franceschinis, E. (2005b). Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int J Pharm*, 291, 69-77.
- Masters, K. (1985) *Spray drying handbook*, New York, Halsted Press.
- Maury, M., Murphy, K., Kumar, S., Shi, L. i Lee, G. (2005). Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *Eur J Pharm Biopharm*, 59, 565-573.
- Miller-Chou, B. A. i Koenig, J. L. (2003). A review of polymer dissolution. *Prog Polym Sci*, 28, 1223-1270.
- Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M. i Bergenstahl, B. (1999). Spray-drying of trypsin - surface characterisation and activity preservation. *Int J Pharm*, 188, 243-253.

- Millqvist-Fureby, A. i Smith, P. (2007). *In-situ* lecithination of diary powders in spray-drying for confectionery applications *Food Hydrocolloids*, 21, 920-927.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. i Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, 385, 113-142.
- Moran, A. i Buckton, G. (2007). Adjusting and understanding the properties and crystallisation behaviour of amorphous trehalose as a function of spray drying feed concentration. *Int J Pharm*, 343, 12-17.
- Muller, R. H., Radtke, M. i Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev*, 54 Suppl 1, S131-155.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P. i Aminabhavi, T. M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*, 125, 193-209.
- O'hagan, D. T. (1998). Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 305-320.
- Ohta, M. i Buckton, G. (2005). A study of the differences between two amorphous spray-dried samples of cefditoren pivoxil which exhibited different physical stabilities. *Int J Pharm*, 289, 31-38.
- Otsuka, M., Onoe, M. i Matsuda, Y. (1993). Hygroscopic stability and dissolution properties of spray-dried solid dispersions of furosemide with Eudragit. *J Pharm Sci*, 82, 32-38.
- Palmieri, G. F., Bonacucina, G., Di Martino, P. i Martelli, S. (2001). Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. I. Water-soluble drugs. *Drug Dev Ind Pharm*, 27, 195-204.
- Palmieri, G. F., Wehrle, P. i Stamm, A. (1994). Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled release. *Drug Dev Ind Pharm*, 20, 2859-2879.
- Parenti, M. A., Hatfield, S. M. i Leyden, J. J. (1987). Mupirocin: a topical antibiotic with a unique structure and mechanism of action. *Clin Pharm*, 6, 761-770.
- Park, T. G., Jeong, J. H. i Kim, S. W. (2006). Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 58, 467-486.
- Patterson, J. E., James, M. B., Forster, A. H., Lancaster, R. W., Butler, J. M. i Rades, T. (2007). Preparation of glass solutions of three poorly water soluble drugs by spray drying, melt extrusion and ball milling. *Int J Pharm*, 336, 22-34.
- Pepić, I., Hafner, A., Lovrić, J., Pirkić, B. i Filipovic-Grčić, J. (2010). A nonionic surfactant/chitosan micelle system in an innovative eye drop formulation. *J Pharm Sci*, 99, 4317-4325.
- Pignatello, R., Amico, D., Chiechio, S., Spadaro, C., Puglisi, G. i Giunchedi, P. (2001). Preparation and analgesic activity of Eudragit RS100 microparticles containing diflunisal. *Drug Deliv*, 8, 35-45.
- Pignatello, R., Vandelli, M. A., Giunchedi, P. i Puglisi, G. (1997). Properties of tolmetin-loaded Eudragit RL100 and Eudragit RS 100 microparticles prepared by different techniques. *STP pharma sciences*, 7, 148-157.
- Pine, S. H., Hendrickson, J. B., Cram, D. J. i Hammond, G. S. (1984) Spektroskopija. *Organska kemija*. Zagreb, Školska knjiga.

- Raffin, R. P., Jornada, D. S., Re, M. I., Pohlmann, A. R. i Guterres, S. S. (2006). Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: effect of the scale of production and process validation. *Int J Pharm*, 324, 10-18.
- Rassu, G., Gavini, E., Spada, G., Giunchedi, P. i Marceddu, S. (2008). Ketoprofen spray-dried microspheres based on Eudragit RS and RL: study of the manufacturing parameters. *Drug Dev Ind Pharm*, 34, 1178-1187.
- Rattes, A. L. R. i Oliveira, W. P. (2007). Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technol*, 171, 7-14.
- Raula, J., Eerikainen, H. i Kauppinen, E. I. (2004). Influence of the solvent composition on the aerosol synthesis of pharmaceutical polymer nanoparticles. *Int J Pharm*, 284, 13-21.
- Ré, M.-I. (2006). Formulating drug delivery systems by spray drying *Drying Technology*, 24, 433-446.
- Rizi, K., Green, R. J., Donaldson, M. i Williams, A. C. Production of pH-responsive microparticles by spray drying: Investigation of experimental parameter effects on morphological and release properties. *J Pharm Sci*.
- Rizi, K., Green, R. J., Donaldson, M. i Williams, A. C. (2011). Production of pH-responsive microparticles by spray drying: Investigation of experimental parameter effects on morphological and release properties. *J Pharm Sci*.
- Rosilio, V., Deyme, M., Benoit, J. P. i Madelmont, G. (1998). Physical aging of progesterone-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharm Res*, 15, 794-798.
- Royall, P. G., Craig, D. Q. i Doherty, C. (1998). Characterisation of the glass transition of an amorphous drug using modulated DSC. *Pharm Res*, 15, 1117-1121.
- Schiffter, H. i Lee, G. (2007a). Single-droplet evaporation kinetics and particle formation in an acoustic levitator. Part 1: evaporation of water microdroplets assessed using boundary-layer and acoustic levitation theories. *J Pharm Sci*, 96, 2274-2283.
- Schiffter, H. i Lee, G. (2007b). Single-droplet evaporation kinetics and particle formation in an acoustic levitator. Part 2: drying kinetics and particle formation from microdroplets of aqueous mannitol, trehalose, or catalase. *J Pharm Sci*, 96, 2284-2295.
- Shah, B., Kakumanu, V. K. i Bansal, A. K. (2006). Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. *J Pharm Sci*, 95, 1641-1665.
- Shoyele, S. A. i Cawthorne, S. (2006). Particle engineering techniques for inhaled biopharmaceuticals. *Adv Drug Deliv Rev*, 58, 1009-1029.
- Sipos, P., Szabó, A., Erős, I. i Szabó-Révész, P. (2008). A DSC and Raman spectroscopic study of microspheres prepared with polar cosolvents by different techniques. *J Therm Anal Calorim*, 94, 109-118.
- Six, K., Verreck, G., Peeters, J., Brewster, M. i Van Den Mooter, G. (2004). Increased physical stability and improved dissolution properties of itraconazole, a class II drug, by solid dispersions that combine fast- and slow-dissolving polymers. *J Pharm Sci*, 93, 124-131.
- Sollohub, K. i Cal, K. (2010). Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *J Pharm Sci*, 99, 587-597.
- Surana, R., Pyne, A. i Suryanarayanan, R. (2004a). Effect of aging on the physical properties of amorphous trehalose. *Pharm Res*, 21, 867-874.



- Surana, R., Pyne, A. i Suryanarayanan, R. (2004b). Effect of preparation method on physical properties of amorphous trehalose. *Pharm Res*, 21, 1167-1176.
- Sutherland, R., Boon, R. J., Griffin, K. E., Masters, P. J., Slocombe, B. i White, A. R. (1985). Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob Agents Chemother*, 27, 495-498.
- Tajber, L., Corrigan, O. I. i Healy, A. M. (2005). Physicochemical evaluation of PVP-thiazide diuretic interactions in co-spray-dried composites--analysis of glass transition composition relationships. *Eur J Pharm Sci*, 24, 553-563.
- Tamber, H., Johansen, P., Merkle, H. P. i Gander, B. (2005). Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 357-376.
- Tao, S. L. i Desai, T. A. (2003). Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 315-328.
- Thakur, R. A., Florek, C. A., Kohn, J. i Michniak, B. B. (2008). Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *Int J Pharm*, 364, 87-93.
- Van Den Mooter, G. (2009) Solid dispersion as a formulation strategy for poorly soluble compounds.  
<http://www.fysikaalinenfarmasia.fi/symposium09/Mooter FFY solid dispersion formulation strategy poorly soluble compounds.pdf>. 28 January 2011.
- Van Drooge, D. J. (2006) Combining the incompatible: inulin glass dispersions for fast dissolution, stabilization and formulation of lipophilic drugs. *Faculty of Mathematics and Natural Sciences*. Leeuwarden, University of Groningen.
- Van Drooge, D. J., Hinrichs, W. L., Visser, M. R. i Frijlink, H. W. (2006). Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques. *Int J Pharm*, 310, 220-229.
- Vehring, R. (2008). Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res*, 25, 999-1022.
- Vehring, R., Foss, W. R. i Lechuga-Ballesteros, D. (2007). Particle formation in spray drying. *Aer Sci*, 38, 728-746.
- Verdonck, E., Schaap, K. i Thomas, L. C. (1999). A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). *Int J Pharm*, 192, 3-20.
- Villari, V. i Micali, N. (2008). Light scattering as spectroscopic tool for the study of disperse systems useful in pharmaceutical sciences. *J Pharm Sci*, 97, 1703-1730.
- Wang, F. J. i Wang, C. H. (2002a). Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres. *J Microencapsul*, 19, 495-510.
- Wang, F. J. i Wang, C. H. (2002b). Sustained release of etanidazole from spray dried microspheres prepared by non-halogenated solvents. *J Control Release*, 81, 263-280.
- Wang, S. i Langrish, T. (2009). A review of process simulations and the use of additives in spray drying *Food Res Int*, 42, 13-25.
- Ward, A. i Campoli-Richards, D. M. (1986). Mupirocin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 32, 425-444.
- Weuts, I., Kempen, D., Verreck, G., Peeters, J., Brewster, M., Blaton, N. i Van Den Mooter, G. (2005). Salt formation in solid dispersions consisting of polyacrylic acid as a carrier

- and three basic model compounds resulting in very high glass transition temperatures and constant dissolution properties upon storage. *Eur J Pharm Sci*, 25, 387-393.
- Wiranidchapong, C.,Tucker, I. G.,Rades, T. i Kulvanich, P. (2008). Miscibility and interactions between 17beta-estradiol and Eudragit RS in solid dispersion. *J Pharm Sci*, 97, 4879-4888.
- Wischke, C. i Schwendeman, S. P. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm*, 364, 298-327.
- Wu, K.,Li, J.,Wang, W. i Winstead, D. A. (2009). Formation and characterization of solid dispersions of piroxicam and polyvinylpyrrolidone using spray drying and precipitation with compressed antisolvent. *J Pharm Sci*, 98, 2422-2431.
- Wulsten, E.,Kiekens, F.,Van Dycke, F.,Voorspoels, J. i Lee, G. (2009). Levitated single-droplet drying: case study with itraconazole dried in binary organic solvent mixtures. *Int J Pharm*, 378, 116-121.
- Ye, M.,Kim, S. i Park, K. (2010). Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *J Control Release*, 146, 241-260.
- Yeo, Y. i Park, K. (2004). Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res*, 27, 1-12.
- Yoshioka, M.,Hancock, B. C. i Zografi, G. (1994). Crystallization of indomethacin from the amorphous state below and above its glass transition temperature. *J Pharm Sci*, 83, 1700-1705.
- Yu, L. (2001). Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Adv Drug Deliv Rev*, 48, 27-42.
- Zhang, Z. Y.,Ping, Q. N. i Xiao, B. (2000). Microencapsulation and characterization of tramadol-resin complexes. *J Control Release*, 66, 107-113.

# ŽIVOTOPIS

## Marjana Dürriegl (djevojačko prezime Majstorović)

<b>Osobni podaci:</b>	Rođena je 10. travnja 1975. godine u Doboju, Republika Bosna i Hercegovina. Državljanica je Republike Hrvatske. Osnovnu školu završila je u Doboju, a Matematičku gimnaziju u Požegi. Živi i radi u Zagrebu.
<b>Školovanje:</b>	Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, studij farmacije, upisala je 1994. godine. Diplomski rad pod naslovom <i>Određivanje fizikalnih karakteristika različitih ljekovitih pripravaka diklofenak natrija</i> obranila je 1999. godine i stekla zvanje magistra farmacije. Poslijediplomski studij farmaceutskih znanosti upisala je 2000. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.
<b>Radno iskustvo:</b>	Od studenog 1999. godine do danas zaposlena je u Plivi Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj generičkih proizvoda, kao analitičarka, voditeljica razvojnih projekata i formulatorica.
<b>Znanstveni interes:</b>	Znanstveni interes kandidatkinje usmjeren je prema istraživanju novih terapijskih sustava s ciljem poboljšanja njihovih farmakokinetičkih svojstava i lakše primjene (specifično tehnologije za kontrolirano oslobađanje lijeka i tehnologije priprave čvrstih disperzija).
<b>Znanstveni radovi:</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Marjana Dürriegl, Ana Kwokal, Anita Hafner, Maja Šegvić Klarić, Aleksandra Dumičić, Biserka Cetina-Čižmek and Jelena Filipović-Grčić, 2011. Spray dried microparticles for controlled delivery of mupirocin calcium: process-tailored modulation of drug release. <i>Journal of Microencapsulation</i>. 28(2):108–121.</li> <li>2. Marjana Dürriegl, Maja Lusina-Kregar, Anita Hafner, Maja Šegvić Klarić and Jelena Filipović-Grčić, 2011. Mupirocin calcium microencapsulation via spray drying: feed solvent influence on microparticle properties, stability and antimicrobial activity. <i>Drug Development and Industrial Pharmacy</i>. In press.</li> <li>3. Anita Hafner, Marjana Dürriegl, Ivan Pepić, Jelena Filipović-Grčić. Short- and long-term stability of lyophilised melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles. 2011. <i>Chemical &amp; Pharmaceutical Bulletin</i>. In press.</li> </ol>
<b>Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Ispitivanje fotostabilnosti injekcijskih otopina prema ICH preporukama</i>, posterska prezentacija, Drugi hrvatski kongres farmacije (2001), Cavtat, Hrvatska</li> <li>2. <i>Impurities nightmare – the way out</i>, oralna prezentacija, 5<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biotechnology (2003), Ljubljana, Slovenija</li> <li>3. <i>Novi generički epileptik gabapentin kapsule - HPLC metoda analize za ispitivanje stabilnosti</i>, posterska prezentacija, Treći hrvatski kongres farmacije (2005), Cavtat, Hrvatska</li> <li>4. <i>Poloxamer influence on rheology, in vitro release and permeability of 1,7-heptanedicarboxylic acid formulations</i>, posterska prezentacija, 7<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biodelivery System (2010), Ljubljana, Slovenija</li> <li>5. <i>Freeze-drying of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles</i>, posterska prezentacija, 8<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, (2010), Graz, Austrija</li> </ol>
<b>Ostala predavanja:</b>	1. <i>Sušenje raspršivanjem u farmaceutici</i> , Hrvatsko farmaceutsko društvo, Sekcija za farmaceutsku tehnologiju, 2010.

## **PRILOZI**

Publikacija 1.

# Spray dried microparticles for controlled delivery of mupirocin calcium: Process-tailored modulation of drug release

Marjana Dürri<sup>1</sup>, Ana Kwokal<sup>2</sup>, Anita Hafner<sup>3</sup>, Maja Šegvić Klarić<sup>3</sup>, Aleksandra Dumičić<sup>1</sup>, Biserka Cetina-Čižmek<sup>1</sup> and Jelena Filipović-Grčić<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PLIVA Croatia Ltd., Research and Development, Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Croatia,

<sup>2</sup>PLIVA Croatia Ltd., TAPI Croatia, TAPI Research and Development, Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Croatia, and <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Technology, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

## Abstract

Spray dried microparticles containing mupirocin calcium were designed as acrylic matrix carriers with modulated drug release for efficient local drug delivery at minimum daily dose. Particle generation in spray drying and its effect on release performance were assessed by varying drug:polymer ratios with consequently altered initial saturations. Narrow-sized microparticles with mean diameters of 1.7–2.5 µm were obtained. Properties of the generated solid dispersions were examined by X-ray, thermal (thermo-gravimetric analysis, modulated differential scanning calorimetry) and spectroscopic (Fourier transformed infrared, Fourier transformed Raman) methods and correlated with drug loading and *in vitro* release. The best control over mupirocin release was achieved for 2:1 (w/w) drug:polymer ratio and found to be strongly process-dependent. For a particular ratio, increased feed concentration (>4%) boosted while increased inlet temperature (≥100°C) reduced drug release. Antimicrobial activity testing confirmed that encapsulated drug preserved its antibacterial effectiveness. Conclusively, spray drying was proven as a suitable method for preparing structured microparticles which can control drug release even at exceptionally high drug loadings.

**Keywords:** Mupirocin calcium, spray drying, solid dispersions, controlled release

## Introduction

Mupirocin calcium (Figure 1) is a topical antibiotic agent chemically derived from pseudomonic acid that has a growth inhibiting effect, mainly against Gram-positive and some Gram-negative bacteria, by inhibiting bacterial protein synthesis due to its binding with isoleucyl transfer RNA synthetase (Ward and Campoli-Richards, 1986). It is primarily bacteriostatic at low concentrations, although it is usually bactericidal at high concentrations. It is presently used not only in various formulations for the treatment of secondarily infected traumatic skin lesions due to susceptible strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* but also as an intranasal topical agent for the

eradication of nasal colonisation with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). It is used three times daily throughout therapy duration (up to 10 days). Multiple daily administrations often diminish patient acceptance and compliance, simultaneously jeopardising curing success. Therefore, a reasonable need exists to develop a drug delivery system that enables extended drug release for the improvement of mupirocin calcium therapy. Amrutiya et al. (2009) recently reported the development of mupirocin-loaded microsponges using an emulsion solvent diffusion method with ethylcellulose polymer.

Microparticles designed to control drug release into the skin ensure that the drug remains localised at the application site and does not unnecessarily enter into the

Address for correspondence: Jelena Filipović-Grčić, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Technology, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia. Tel: +38516394761. Fax: +38514612691. E-mail: jfilipov@pharma.hr

(Received 16 May 2010; accepted 20 Oct 2010)  
<http://www.informahealthcare.com/mnc>

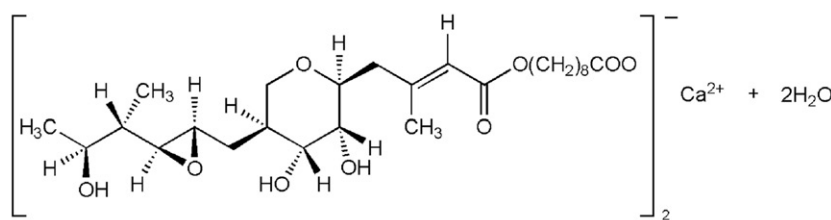


Figure 1. Mupirocin calcium dihydrate.

Source: Bactroban cream, Available at: [http://us.gsk.com/products/assets/us\\_bactroban\\_cream.pdf](http://us.gsk.com/products/assets/us_bactroban_cream.pdf). Accessed 10 November 2010.

systemic circulation (Embil and Nacht, 1996). They act as reservoirs releasing an active ingredient over an extended period of time maintaining effective drug concentration in the skin and, at the same time, reducing undesired side effects. Thus, periods of over-medication and under-medication are eliminated. This is especially important in the treatment of infectious diseases due to the prevention of antimicrobial resistance. Such delivery systems may also increase drug stability or improve incorporation into appropriate vehicles.

Certain articles describe the use of a spray drying technique for the preparation of controlled-release microparticles (Kristmundsdóttir et al., 1996; Pignatello et al., 1997; Esposito et al., 2000; Cortesi et al., 2007; Rattes and Oliveira, 2007; Al-Zoubi et al., 2008; Chen et al., 2008; Rassu et al., 2008) utilising water-insoluble and low-permeability acrylic polymers, e.g. ammonium methacrylate copolymers (Eudragit® RS). Specifically, Rattes and Oliveira (2007) have found that an increase in feed flow rate enlarged the mean particle diameter and obtained slower drug release. Esposito et al. (2000) and Rassu et al. (2008) reported that the increase in inlet temperature resulted in the reduction of microparticle size, while no correlation to drug release was reported. It was shown that the solvent type determines the structure of resultant microparticles influencing the drug release pattern (Kristmundsdóttir et al., 1996). The increase in the polymer-to-drug ratio resulted in decreased drug release (Al-Zoubi et al., 2008). Pignatello et al. (1997) have shown that, due to the high porosity of spray dried microparticles, drug release is poorly controlled.

Spray drying is a one-step, but complex, technological process that enables the adjustment of many parameters. In light of current reports on particle engineering approaches (Hadinoto et al., 2007; Vehring, 2008; Kawakami et al., 2010) understanding how the variation of parameters will affect the physicochemical properties of a product and its performance is considered essential. It is necessary to have full understanding of the physical state of the drug in microparticles, as these attributes may profoundly affect the release behaviour. However, it is also evident that no individual parameter, but rather a combination of all factors, is responsible for controlling the output.

The purpose of this study was to investigate spray drying encapsulation of mupirocin calcium into acrylic microparticles with the ultimate goal to modulate drug release for efficient local drug delivery at a minimum

daily dose. To the best of our knowledge, this is the first attempt to encapsulate mupirocin calcium into acrylic polymer microparticles by spray drying. Additionally, we aimed to assess particle generation in spray drying and its effect on release performance by varying different drug:polymer ratios, namely 5:1; 2:1; 1:1; 1:2 and 1:5 (w/w). The microparticles were evaluated with respect to encapsulation efficiency, production yield, particle size, morphology, *in vitro* drug release and solid-state properties.

## Materials and methods

### Materials

Mupirocin calcium was kindly donated by Pliva Croatia Ltd., Zagreb, Croatia. Eudragit® RS 100 (ammonio methacrylate copolymer type B, NF) was obtained from Evonik, Essen, Germany. Methanol and tetrahydrofuran of the grade intended for liquid chromatography and ammonium acetate p.a. were provided by Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Sodium acetate trihydrate, p.a. was provided by Kemika, Zagreb, Croatia. Potassium bromide for infrared (IR) spectroscopy was obtained from Merck, Darmstadt, Germany. Ultrapure water was used in all experiments.

### Preparation of microparticles

Drug-loaded microparticles were prepared by spray drying methanol solutions containing different ratios of Eudragit® RS 100 polymer and mupirocin calcium. Eudragit® RS 100 was dissolved in methanol using the ultrasonic bath until complete dissolution of polymer was achieved and left for 24 h before the drug was added. Mupirocin calcium has been dissolved in the polymer solution by gentle stirring and spray dried immediately. The following weight ratios (w/w) of drug and polymer were used: 5:1; 2:1; 1:1; 1:2 and 1:5. The total amount of solid material dissolved in the spraying solution (feed concentration) was 3% (w/w) for all experiments. In addition, the samples containing 2:1 (w/w) drug:polymer ratio having feed concentrations of 1%, 2%, 4% and 5% (w/w) were also prepared.

Spray drying was performed using a Büchi B-290 mini spray drier (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) with the Inert Loop B-295, which enabled safe operation

with organic solvents in a closed loop. The spray dryer operates by the co-current flow of a nitrogen (spraying medium) and product stream with an integrated two-fluid 0.7-mm nozzle. Compressed nitrogen was used to disperse the liquid into fine droplets, which were consequently dried in the cylinder and deposited in the cyclone. Drying conditions are given as follows for all prepared samples: the aspirator setting was 85%; the pump flow rate was 40% and the compressed nitrogen flow rate was 670 NL/h. A small high-performance cyclone was used to increase the yield. The inlet temperature was varied for different experiments; details are given in Tables 1–3. The drug was individually spray dried from 2% (w/w) methanol solutions under the same processing conditions as the corresponding microparticles at 100°C to obtain the amorphous drug. The spray dried polymer was produced in the same way. The amorphous materials of drug and polymer were used for comparison purposes. All obtained powders were collected in glass containers and stored in desiccators at the ambient temperature.

#### Determination of drug loading

Mupirocin calcium content in the microparticles was determined by the HPLC assay method described in the United States Pharmacopeia (USP), 31st edition, Suppl. 2, 2009. An appropriate amount of microparticles was dissolved in methanol under sonication in an ultrasonic bath (Julabo USR3, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany) for 30 min to obtain 0.1 mg/mL of mupirocin calcium. An HPLC system, which consisted of an Agilent 1100 Series instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector set at 230 nm, was used to perform the assay. The mobile phase, a degassed and filtered mixture of 0.1 M ammonium acetate and tetrahydrofuran in the ratio of 68:32, was used at a flow rate of 1 mL/min. The column (Zorbax Eclipse XDB C8 column 250 × 4.6 mm<sup>2</sup>, particle size 5 µm, Agilent, Palo Alto, CA, USA) suited with a guard column (Symmetry C8, particle size 5 µm, 3.9 × 20 mm, Waters, Dublin, Ireland) was operated at 35°C. The sample

Table 1. Characteristics of the microparticles spray dried at 100°C containing different drug:polymer ratios (w/w).

Sample (drug:polymer ratio, w/w)	Drug loading (% ± SD)	Mean spherical diameter (µm ± SD)	$T_g$ (°C ± SD)	$T_g'$ (°C ± SD)	GT (°C)	Residual solvent (% ± SD)
I (1:5)	15.7 ± 0.1	1.85 ± 1.40	60.7 ± 2.6	59.0 ± 0.4	~59.5	0.94 ± 0.01
II (1:2)	31.7 ± 0.2	2.25 ± 1.86	66.9 ± 1.3	78.8 ± 1.4	~62.4	0.80 ± 0.01
III (1:1)	47.6 ± 0.7	2.25 ± 1.86	66.7 ± 1.4	78.3 ± 0.1	~65.7	0.98 ± 0.03
IV (2:1)	63.7 ± 1.4	1.74 ± 1.29	65.5 ± 1.3	76.8 ± 0.4	~69.3	1.24 ± 0.05
V (5:1)	78.1 ± 2.8	2.45 ± 1.89	66.3 ± 0.8	77.3 ± 0.6	~73.3	1.32 ± 0.09

Notes: Drug loading – percent ratio (% w/w) of drug present in microparticles; SD – standard deviation ( $n=3$ );  $T_g$  – glass transition temperature;  $T_g'$  – glass transition temperature after heat-cool-heat cycle and GT – Gordon-Taylor prediction of  $T_g$  value of drug and polymer mixture calculated using Equations (1) and (2).

Table 2. Characteristics of the microparticles containing drug:polymer ratio 2:1 (w/w) spray dried from 3% (w/w) feed solution at different inlet temperatures.

Sample	Inlet temperature (°C)	Outlet temperature (°C)	Drug loading (% ± SD)	Mean spherical diameter (µm ± SD)	$T_g$ (°C ± SD)	Residual solvent (% ± SD)
IV-110	110°C	70–60°C	64.1 ± 0.3	1.88 ± 1.54	67.2 ± 1.9*	1.12 ± 0.09
IV-100	100°C	65–53°C	63.7 ± 1.4	1.74 ± 1.29	65.5 ± 1.3	1.24 ± 0.05
IV-90	90°C	56–46°C	63.6 ± 0.0	2.01 ± 1.55	62.9 ± 2.4	1.32 ± 0.03
IV-80	80°C	47–41°C	62.4 ± 0.1	2.49 ± 2.10	62.8 ± 2.4	1.33 ± 0.08
IV-70	70°C	41–37°C	63.5 ± 0.3	2.18 ± 1.96	59.7 ± 3.6*	1.44 ± 0.08

Table 3. Characteristics of the microparticles containing drug:polymer ratio 2:1 (w/w) spray dried at 100°C from different feed solutions.

Sample	Feed concentration (%; w/w)	Drug loading (% ± SD)	Mean spherical diameter (µm ± SD)	$T_g$ (°C ± SD)	Residual solvent (% ± SD)
IV-1%	1	63.7 ± 0.0	2.02 ± 1.86	66.7 ± 1.1	1.14 ± 0.17
IV-2%	2	64.0 ± 0.3	1.72 ± 1.40	65.5 ± 2.5	1.17 ± 0.15
IV-3%	3	63.7 ± 1.4	1.74 ± 1.29	65.5 ± 1.3	1.24 ± 0.05
IV-4%	4	63.9 ± 0.5	2.46 ± 1.83	65.7 ± 2.1	1.08 ± 0.17
IV-5%	5	63.7 ± 0.5	2.67 ± 1.87	63.1 ± 1.5	1.57 ± 0.06

Notes: Drug loading – percent ratio (% w/w) of drug present in microparticles; SD – standard deviation ( $n=3$ ) and  $T_g$  – glass transition temperature.



injection volume was 20  $\mu$ L. The elution was isocratic and the run time was 10 min. All experiments were performed in triplicate, and the mean of the obtained values has been reported. Drug loading was determined as a percent ratio (w/w%) of the drug present in the microparticles.

#### In vitro drug release study

Drug release study was performed using a USP Apparatus 2 paddle apparatus (PharmaTest type PTW S, PharmaTest Apparatebau GmbH, Hainburg, Germany). A predetermined amount of microparticles was placed into 500 mL of degassed pH 5.5 USP acetate buffer, and the temperature was maintained at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . The paddle speed was 20 rpm. Aliquots (5 mL) were withdrawn at predetermined time points, filtered through glass fibre prefilters (Acrodisc® GF 25-mm syringe filters with GF/0.45 GHP membrane, Pall, Bad Kreuznach, Germany) and analysed, according to the HPLC assay method described above. The withdrawn aliquots were replaced with fresh dissolution medium thermostated at  $37^\circ\text{C}$ . The amount of microparticles was calculated to maintain the sink condition of mupirocin calcium in the given medium pH (the solubility of mupirocin calcium amorphous in pH=5.5 acetate buffer is more than 20 mg/mL). The targeted drug concentration was 0.1 mg/mL if complete release from microparticles is assumed. All analyses were performed in triplicate.

Mupirocin release kinetics were modelled using mono-exponential and biexponential equations (Table 4; GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA; www.graphpad.com) to better understand the release behaviour of the microparticles. A biexponential model has been used to separate burst ( $k_1$  rate constant) and sustained release phases ( $k_2$  rate constant) of dissolution profiles and enable their comparison (Beck et al., 2007; Lionzo et al., 2007).

#### Particle size analysis

A microscopic image analysis technique for the determination of microparticle size distribution was applied. The particle size distributions (based on the numbers of particles) were determined using an Olympus BH-2 microscope equipped with a camera (CCD Camera ICD-42E; Ikegami Tsushinki Co., Tokyo, Japan) and computer-controlled image analysis system (Optomax V, Cambridge, UK). The microspheres were dispersed on a microscope slide. A microscopic field was scanned by video camera. The images of the scanned fields were digitised and analysed by the software (Optomax V Software, Cambridge, UK). In all measurements, at least 3000 particles were examined.

#### Thermal analyses

Modulated differential scanning calorimetry (MDSC) analyses were carried out in a TA Instrument modulated DSC Q1000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) using aluminium hermetic pans with pierced lids (to allow removal of residual solvent) with about 2–4 mg of sample, under dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min). The samples were heated at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  from  $20^\circ\text{C}$  to  $200^\circ\text{C}$  using a modulation of  $\pm 0.8^\circ\text{C}$  (amplitude) each 60 s (period). The glass transition temperature ( $T_g$ ) was determined using the TA universal analyses software by extrapolating the linear portion of the DSC curve above and below the glass transition point and determining the midpoint temperature in the reverse heat flow curve. The analyses were done in triplicate.

Additionally, the samples were subjected to a cyclic heating programme (heat-cool-heat). The programme included sample heating up to  $200^\circ\text{C}$  and cooling back to  $20^\circ\text{C}$  under controlled conditions (ramp  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ ) following a second heating run from  $20^\circ\text{C}$  up to  $200^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Table 4. Model parameters of mupirocin calcium release from Eudragit® RS spray dried microparticles.

Sample	Monoexponential model $Q = 100(1 - e^{-kt})$		Biexponential model $Q = 100[1 - (Ae^{-k_1t} + Be^{-k_2t})]$				
	$R^2$	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	$A$	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$B$	$k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ )
I	0.9765	$0.265 \pm 0.033$	0.9999	$0.635 \pm 0.017$	$0.479 \pm 0.044$	$0.220 \pm 0.025$	$0.028 \pm 0.004$
II	0.9901	$0.337 \pm 0.030$	0.9999	$0.761 \pm 0.018$	$0.521 \pm 0.045$	$0.161 \pm 0.025$	$0.033 \pm 0.005$
III	0.9900	$0.293 \pm 0.024$	0.9976	$0.642 \pm 0.119$	$0.556 \pm 0.229$	$0.232 \pm 0.130$	$0.064 \pm 0.024$
IV*	0.9434	$0.134 \pm 0.028$	0.9944	$0.506 \pm 0.036$	$0.376 \pm 0.063$	$0.356 \pm 0.053$	$0.025 \pm 0.005$
V	0.9922	$0.349 \pm 0.019$	0.9999	$0.792 \pm 0.007$	$0.503 \pm 0.016$	$0.142 \pm 0.010$	$0.030 \pm 0.002$
IV-110	0.9624	$0.047 \pm 0.011$	0.9996	$0.321 \pm 0.029$	$0.346 \pm 0.061$	$0.555 \pm 0.042$	$0.024 \pm 0.002$
IV-90	0.9838	$0.362 \pm 0.070$	1.0000	$0.761 \pm 0.005$	$0.599 \pm 0.031$	$0.176 \pm 0.010$	$0.021 \pm 0.002$
IV-80	0.9886	$0.324 \pm 0.049$	0.9999	$0.786 \pm 0.010$	$0.483 \pm 0.025$	$0.168 \pm 0.016$	$0.027 \pm 0.003$
IV-70	0.9846	$0.305 \pm 0.051$	0.9999	$0.724 \pm 0.007$	$0.466 \pm 0.018$	$0.177 \pm 0.011$	$0.024 \pm 0.002$
IV-5%	0.9894	$0.271 \pm 0.036$	0.9999	$0.759 \pm 0.010$	$0.424 \pm 0.017$	$0.168 \pm 0.015$	$0.027 \pm 0.003$
IV-4%	0.9305	$0.112 \pm 0.037$	1.0000	$0.492 \pm 0.002$	$0.315 \pm 0.006$	$0.372 \pm 0.007$	$0.015 \pm 0.000$
IV-2%	0.9994	$0.090 \pm 0.026$	0.9997	$0.431 \pm 0.020$	$0.358 \pm 0.040$	$0.412 \pm 0.032$	$0.023 \pm 0.002$
IV-1%	0.9488	$0.121 \pm 0.034$	0.9977	$0.500 \pm 0.059$	$0.380 \pm 0.109$	$0.391 \pm 0.089$	$0.025 \pm 0.006$

Notes:  $Q$  – percentage of drug released;  $k$ ,  $k_1$  and  $k_2$  – rate constants;  $A$  and  $B$  – the parameters which reflect the portion of the drug released that contributed to the burst and sustained phases, respectively;  $R^2$  – coefficient of determination.

\*Sample IV  $\equiv$  sample IV-100  $\equiv$  sample IV-3%.



using a modulation of  $\pm 0.8^{\circ}\text{C}$  (amplitude) each 60 s (period) in each step. This allowed residual solvent to be removed from the microparticles and  $T_g'$  to be determined. The analyses were done in triplicate.

Thermogravimetric (TG) curves were obtained using a TGA-7 thermogravimetric analyser (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), using platinum pans with about 5 mg of sample under dynamic nitrogen atmosphere (35 mL/min) and at a heating rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , from  $30^{\circ}\text{C}$  to  $250^{\circ}\text{C}$ . These analyses enabled the determination of the total amount of the volatile substance (residual solvent). The spectroscopy were done in triplicate.

#### Fourier transformed infrared analyses

The IR spectra were recorded on a Nicolet 6700 Fourier transformed infrared (FT-IR) instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) equipped with a fast recovery deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector, working under the Omnic software version 4.1. A spectra of  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ , resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  and accumulation of 32 scans were used to obtain good-quality spectra. The KBr disc method was used with approximately 0.5% (w/w) of sample loading.

#### Fourier transformed Raman spectroscopy

Raman spectra were collected on a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer with an NXR FT-Raman module (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), equipped with a 1064-nm Nd:YVO<sub>4</sub> excitation laser, CaF<sub>2</sub> beamsplitter and Ge detector. Data were collected using Omnic software version 4.1. A spectral range of  $3700\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  was employed with  $4\text{ cm}^{-1}$  resolution and accumulation 128.

#### X-ray powder diffraction analyses

X-ray powder diffraction (XRPD) data were recorded on a Philips X'Pert PRO diffractometer (PAN Analytical, Kassel Waldau, Germany) equipped with an X'Celerator detector ( $2.022^{\circ} 2\theta$ ) using Cu-K $\alpha$  radiation at 45 kV and 40 mV. The scan angle range ( $2\theta$ ) was  $2\text{--}50^{\circ}$ , the step size ( $2\theta$ ) was  $0.017^{\circ}$  and the time per step was 50 s. Samples were powdered using mortar and pestle and applied directly into a Phillips' original circular sample holder (16 mm diameter), manually pressed with the sample preparation kit and closed with the bottom plate. Diffractograms were analysed using X'Pert Data Collector software.

#### Scanning electron microscopy

The morphology of the microspheres was observed by scanning electron microscopy (SEM; JEOL, Type JSM-5800, Tokyo, Japan). Prior to examination, the samples were mounted on a double-sided adhesive and coated

with a thin layer of gold, under vacuum. The scanning electron microscope was operated at an acceleration voltage of 15 kV.

#### Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of drug-loaded microparticles was investigated and compared to the drug and drug-free microparticles activity as control. Microparticles were suspended while the drug was dissolved in degassed pH 5.5 USP acetate buffer (dissolution medium) immediately prior to examination obtaining final drug concentration of  $400\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ . Additionally, samples obtained at the end of *in vitro* release testing of the microparticles were subjected to antimicrobial testing.

Antimicrobial activity was tested on *S. aureus* (ATCC 29213; ATCC, American Type Culture Collection). Twofold microdilution assay using Mueller-Hinton broth (Sigma, Munich, Germany) was carried out following CLSI guidelines (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001). A  $1\text{--}2 \times 10^8$  colony-forming unit (cfu)/mL inoculum was prepared and adjusted to a final concentration of  $1\text{--}2 \times 10^5$  cfu/mL in broth containing drug, drug-loaded microparticles and drug released from microparticles in twofold dilutions ranging from 0.0625 to  $256\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  on a microtitre plate. Culture of *S. aureus* in the broth was used as positive (growth) control, while broth without *S. aureus* as negative control. The minimal inhibitory concentration (MIC) was recorded as the lowest concentration of mupirocin calcium that inhibited visible bacterial growth after 18 h of incubation at  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . After incubation of 3, 6 and 18 h, dilutions ( $10\text{ }\mu\text{L}$ ) were subcultured on Mueller-Hinton agar plates and the formation of colonies was observed after 18 h of incubation at  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . In this experiment, the lowest concentration of mupirocin calcium-containing samples at which *S. aureus* count was reduced by 99% of initial inoculum was recorded as minimal bactericidal concentration (MBC) in relation to the time of incubation. All experiments were done in triplicate.

#### Statistical analysis

The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). A one-way analysis of variance was employed in the comparison of the experimental data. *Post-hoc* multiple comparisons were done by Tukey's test for significance at *p*-values less than 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## Results and discussion

#### Influence of drug loading on microparticle performance

By altering the initial saturation of feed constituents, different particle solidification patterns and deposition kinetics were expected. Additionally, although rarely

examined for controlled microparticle delivery systems, the higher ratios of drug to polymer were studied. The rationale for such experimental design is based on the assumption that the radial distribution of components within a particle depends on the initial saturation and diffusivity of each solute in a solution intended to be used in spray drying, affecting also particle morphology and density (Bain et al., 1999; Kim et al., 2003; Lechuga-Ballesteros et al., 2008; Wang and Langrish, 2009). During drying, there is a diffusion of solvent towards the surface and solute/s towards the centre because of the concentration gradient caused by the evaporation of solvent from the droplet surface. Transport velocities of different solutes will depend on the concentration gradient, the medium viscosity and the solute diffusivity (Kim et al., 2003; Wang and Langrish, 2009).

#### *Drug loading, morphology and particle size*

Yields of powders produced were in the range 53–59%. The microparticles were in the form of a fine white powder. Drug loading for each microparticle composition was in compliance with theoretical values (Table 1). These observations of successful microencapsulation by spray drying from solution (drug and polymer being both dissolved) are already reported in the literature (Pignatello et al., 1997; Wang and Wang, 2002; Rassa et al., 2008). The methodology that uses the solution of polymer and drug provides a homogeneous distribution of solutes in the initially atomised microdroplet. The inherent homogeneity of the starting solution is retained within the drying droplet, resulting in microparticles having drug loading similar to that of the initial solution. However, depending on the rate of the solvent evaporation, the diffusivity of the solutes and potential surface activity, the radial distribution of the drug and polymer may be changed within a particle before complete solidification is reached (Vehring, 2008).

Figure 2 represents the SEM images of all drug-loaded microparticles differing in drug:polymer ratio. Figures 2(a) and 2(e) represent microparticles of the lowest (sample I) and the highest drug loading (sample V), respectively. For both of them, deviation from the spherical shape is easily observed. The morphology of microparticles has been markedly influenced by drug loading; various ratios of drug and polymer influenced deposition kinetics due to different initial saturations resulting in diverse morphologies. In contrast, microparticles having 1:2 (sample II, Figure 2(b)), 1:1 (sample III, Figure 2(c)) and 2:1 (sample IV, Figure 2(d)) drug:polymer ratios (w/w) are mostly spherical with seemingly smooth surfaces absent of visible pores and other major surface discontinuities. No free or incorporated drug crystals were observed on their surface. The surface is generally smooth when polymer precipitates slowly with sufficient time to shrink its size and occurs due to either slow removal of organic solvent or high solubility of solutes in the particular solvent (Bain et al., 1999; Mandal et al., 2001). When higher amounts of either drug or polymer have been used (samples I and V, respectively), higher initial saturations

could have induced an earlier onset of phase transition in the drying droplet, affecting the morphologies of microparticles obtained (Wang and Wang, 2002). The increased polymer content resulted in wrinkled particles, which were probably formed earlier in the drying process with a polymer-enriched soft surface layer (crust) that folded to form the wrinkled particles (Vehring, 2008).

The particle size analysis results suggest that the particles were of similar size with mean spherical diameter ranging between 1.7 and 2.5 µm (Table 1). Small particle sizes could be attributed to the relatively low viscosity of the spraying solution (low concentration of solutes) and high compressed nitrogen flow rate. Additionally, no correlation has been found between drug loading and the particle sizes obtained.

#### *Solid-state characterisation of microparticles*

X-ray diffractograms of crystalline and spray dried drug microparticles having different drug:polymer ratios (w/w) (samples I–V) and spray dried polymer are shown in Figure 3. Mupirocin calcium lost its regular ordered lattice structure, becoming amorphous during the spray drying process, with a typical halo baseline observed in the X-ray diffractogram. Amorphous halos are slightly different among particular microparticles due to differences in the weight ratios of the drug and the polymer. All these observations suggest that mupirocin calcium and polymer structure solid dispersion with no measurable crystallisation of the drug. Formation of amorphous structure could be connected to a short precipitation window, which disables the crystallisation process, and the drug remains in a fairly disordered form.

Thermal analyses of such amorphous systems enable the determination of drug and polymer miscibility behaviour using the well-known Gordon–Taylor (GT) equation:

$$T_g = \frac{(w_1 T_{g1} + Kw_2 T_{g2})}{(w_1 + Kw_2)}, \quad (1)$$

$$K = \frac{\rho_1 T_{g1}}{\rho_2 T_{g2}} \quad (2)$$

where  $T_g$  is the glass transition temperature of a mixture;  $T_{g1}$ ,  $w_i$  and  $\rho_i$  are the glass transition temperature, weight fraction and density of each mixture component (Hancock and Zografi, 1997; Wiranidchabong et al., 2008). This equation predicts the behaviour of a binary mixture based on free volume theory assuming no specific interaction between two components. It is helpful in determining if nonidealities of prepared microsystems exist (e.g. specific drug–polymer interactions, immiscibility) (Hancock and Zografi, 1997).

The thermogram of crystalline drug is characterised by an endothermic peak appearing at the midpoint temperature of 133.9°C and was attributed to the melting point ( $T_m$ ). Amorphous, spray dried mupirocin calcium has shown a glass transition temperature ( $T_g$ ) at  $59.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  in reverse heat flow curves that enable the detection of the transition being overlapped with the desolvation endotherm in the total heat flow curve. When a heat-cool-

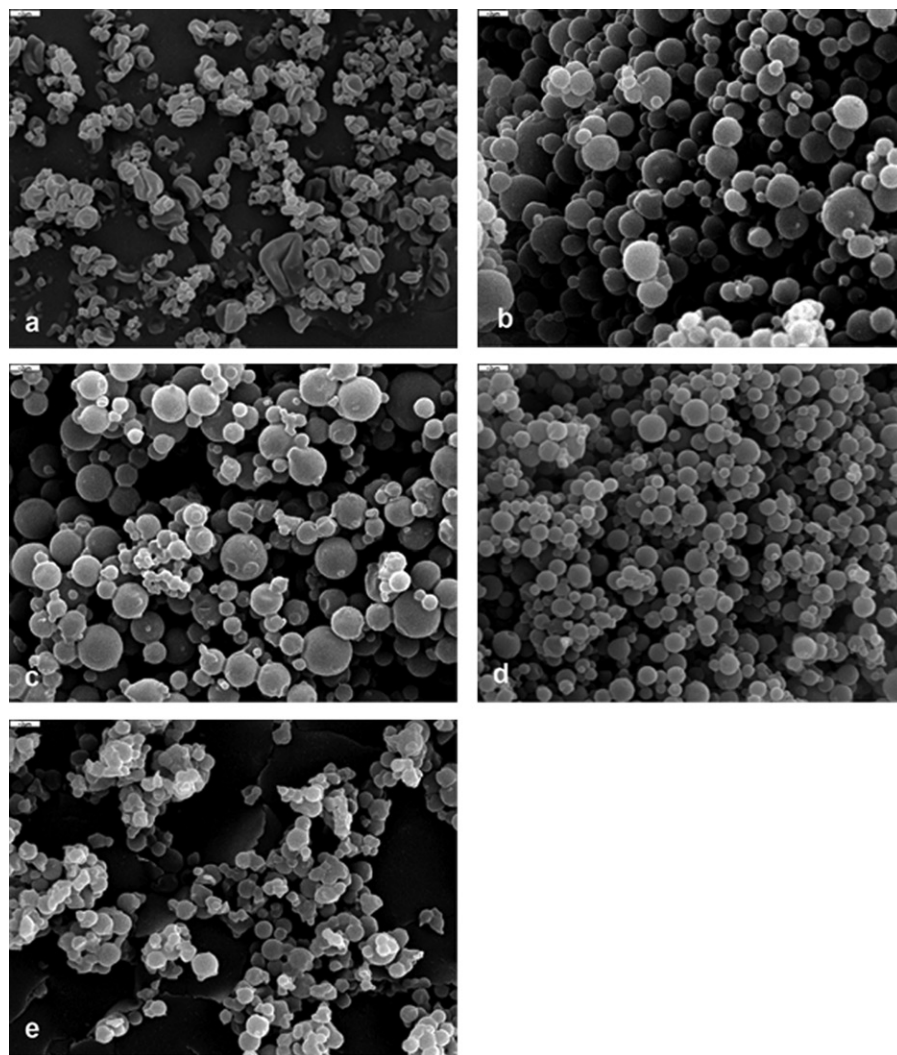


Figure 2. SEM images of the microparticles spray dried at 100°C having different drug : polymer ratios (w/w): (a) sample I; (b) sample II; (c) sample III; (d) sample IV; and (e) sample V.

heat cycle was applied, the glass transition temperature in the second heating run was shifted to  $77.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$ , indicating a plasticising effect of residual methanol ( $\sim 1.4\%$ ) on spray dried mupirocin calcium. The change in specific heat capacity at the glass transition ( $\Delta C_p$ ) for amorphous mupirocin calcium was  $0.411 \pm 0.061 \text{ J/g/}^\circ\text{C}$ . Moreover, spray dried Eudragit<sup>®</sup> RS polymer had a glass transition temperature at  $56.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (Dillen et al., 2006; Sipos et al., 2008) and the change in specific heat capacity at the glass transition ( $\Delta C_p$ ) was  $0.156 \pm 0.035 \text{ J/g/}^\circ\text{C}$ . Residual methanol ( $\sim 0.9\%$ ) had no effect on the glass transition temperature of spray dried polymer, as confirmed by the heat-cool-heat cycle ( $T_g' = 56.8 \pm 0.0^\circ\text{C}$ ).

All microparticle thermograms were characterised by the absence of melting peak at  $\sim 133^\circ\text{C}$  indicating that the drug was fully amorphous. These results additionally verify the X-ray findings (Figure 3). A single glass transition temperature has been observed for all microparticles (Table 1), suggesting that drug and polymer structured solid dispersions at the molecular level achieving complete miscibility for all drug : polymer ratios. It is also evident from TGAs that the microparticles contained certain

amounts of residual solvent (Table 1). Samples with higher drug contents (samples IV and V) had somewhat higher amounts of the residual solvent with respect to other microparticles. Based on these data, it was not possible to differentiate if the observed glass transition temperature is a result of microparticle composition or is influenced by residual solvent. The results of glass transition temperature ( $T_g'$ ) obtained using the heat-cool-heat cycle are also shown in Table 1. Residual solvent removal had no effect on the microparticles with the lowest drug content (sample I). The  $T_g'$  value ( $59.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ , Table 1) of these microparticles matched well with the GT predicted value of  $\sim 59.5^\circ\text{C}$  (calculated using Equations (1) and (2)), assuming no density differences between drug and polymer. Additionally,  $T_g'$  values for samples II-V resulted in glass transition temperatures higher than expected based on the GT equation. However, MDSC analyses of corresponding physical mixtures revealed that the obtained results were not due to the actual increase in  $T_g'$  but, rather, as a consequence of phase separation caused by the heat-cool-heat cycle forming a single broad thermal event originating from two consecutive thermal events of



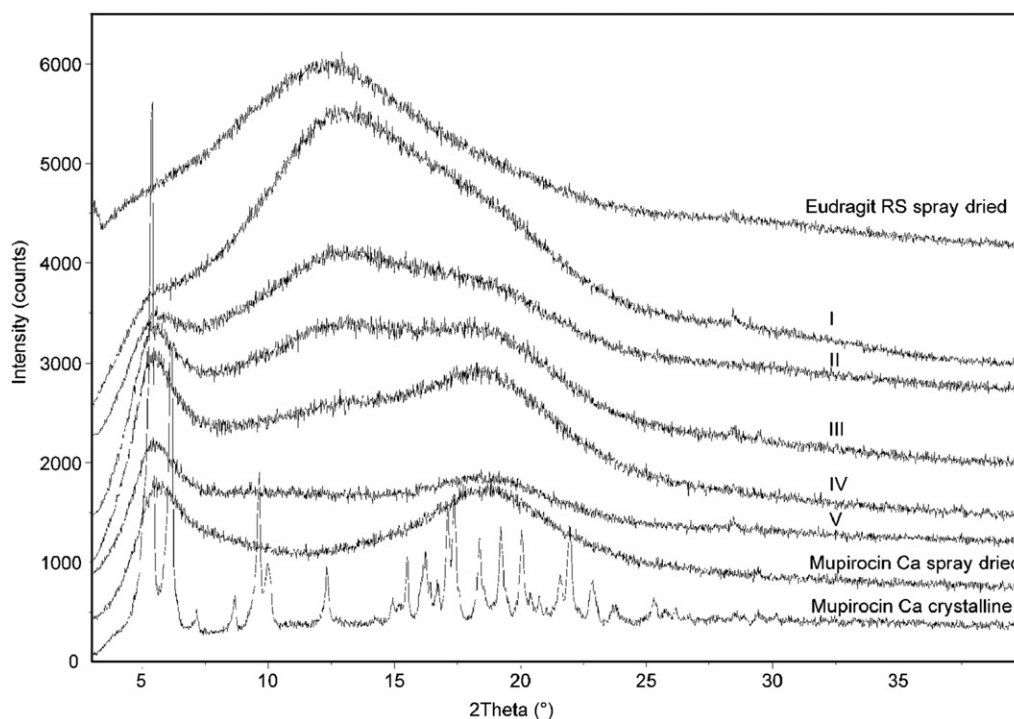


Figure 3. X-ray diffractograms of the crystalline and spray dried mupirocin calcium, microparticles (samples I-V) and spray dried polymer.

the drug and polymer. Therefore, only limited information about solvent influence on microparticles was gained using the heat-cool-heat methodology. This also precluded interpretation of  $T_g$  values in terms of possible deviations from GT predictions.

To further understand microparticle fine structure, FT-IR and Raman analyses were conducted. The microparticle spectra were compared to the spectra of amorphous drug and polymer prepared by the same procedure. The FT-IR spectra of microparticles (Figure 4(a)) corresponded to the actual composition of drug and polymer, i.e. generally corresponded to the spectra of its physical mixtures. However, the region of carbonyl stretching,  $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ , assigned to the ester group for both drug and polymer shows discrepancy between microparticles and the physical mixture in terms of the shape and position of bands. The C=O stretching at  $1713\text{ cm}^{-1}$  in the spectra of the amorphous drug was shifted to higher wavenumbers in the spectra of sample IV, seen as the shoulder at  $1695\text{ cm}^{-1}$  (Figure 4(b)).

Raman spectra (Figure 5) exhibited even more pronounced bands in the region of carbonyl stretching giving complementary information to the FT-IR spectra. The C=O band stretching in the Raman spectra is observed at  $1710.9\text{ cm}^{-1}$  for drug and at  $1727.4\text{ cm}^{-1}$  for polymer, while the spectrum of microparticle sample IV (2:1 (w/w) drug:polymer ratio) exhibited a single band for the corresponding carbonyl stretching band at  $1722.2\text{ cm}^{-1}$ ; this band shifted to higher wavenumbers with respect to the drug and to lower wavenumbers with respect to the polymer. Moreover, the Raman spectrum of sample III (1:1 (w/w) drug:polymer ratio) exhibited carbonyl stretching at  $1714.0\text{ cm}^{-1}$ , which was also shifted to

higher wavenumbers with respect to the same band of the drug. Therefore, the altered molecular surroundings of the drug proved to be present within microparticles and were presumed to be affected by molecular interactions between the drug and the polymer chains. Weaker drug-polymer intermolecular hydrogen bonding, in comparison to drug-drug interactions, were revealed due to the C=O band shift towards higher wavenumbers. These findings provide evidence of the existence of finely dispersed drug and polymer within the microparticles for the examined samples III and IV.

On the other hand, for the case of 5:1 (w/w) drug:polymer ratio (sample V), the C=O stretching band in the FT-IR spectra (Figure 4) was split into two bands, with  $1732$  and  $1714\text{ cm}^{-1}$  positions reflecting the presence of a separated amorphous drug phase. This finding shows that even though a single glass transition event was observed in MDSC, phase separation was detected using FT-IR measurements. This may be partially attributed to the inability of the applied MDSC methodology to separate very close thermal events. Janssens et al. (2008) also reported that a single glass transition event was obtained even though X-ray photoelectron spectroscopy indicated the presence of more than a one phase.

#### *In vitro drug release study*

Figure 6 shows the drug release profiles obtained for microparticles containing different drug loadings. Mathematical modelling was used to analyse the drug release profiles (Table 4). The selection of the model was based on the best coefficient of determination and the best graphic adjustment. All microparticles were best fitted by a biexponential model (Table 4).

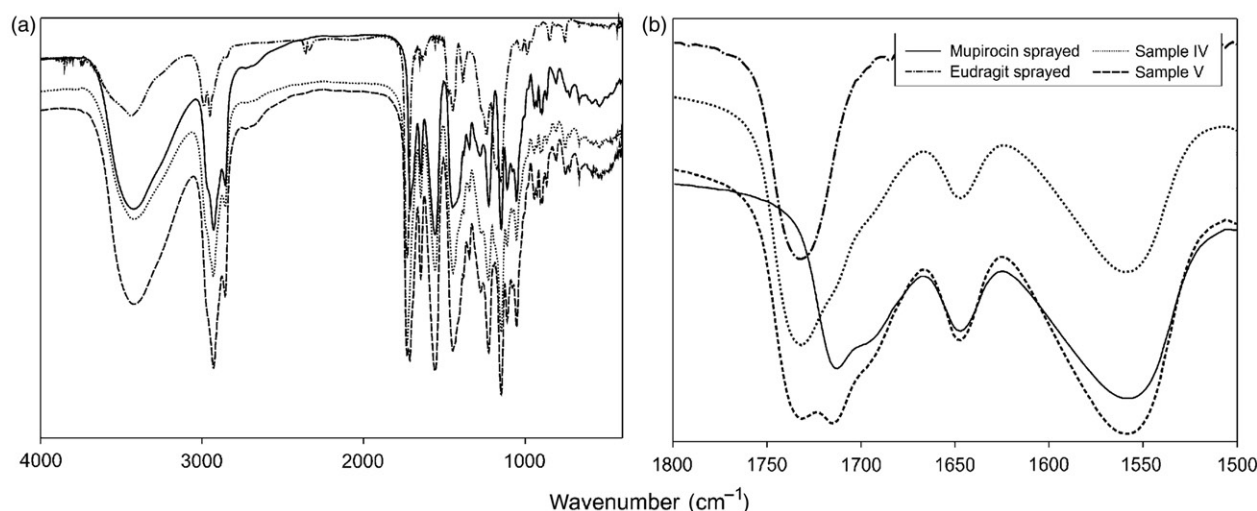


Figure 4. (a) FT-IR spectra of the drug, polymer and microparticles having different drug:polymer ratios (w/w): sample IV (2:1) and sample V (5:1). (b) FT-IR spectra (zoomed region between 1500 and 1800 cm<sup>-1</sup>) of the drug, polymer and microparticles having different drug:polymer ratios (w/w): sample IV (2:1) and sample V (5:1).

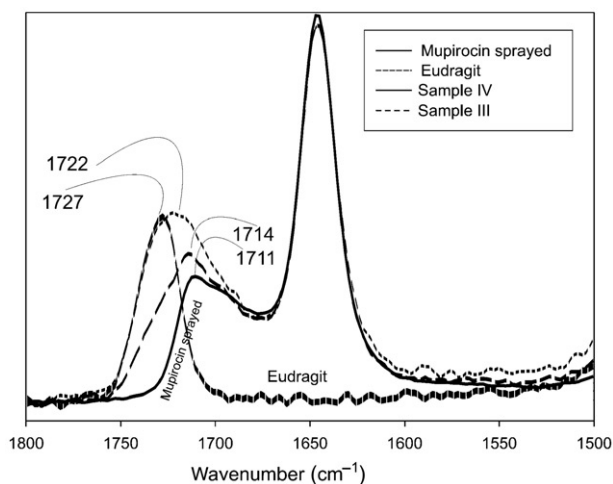


Figure 5. Raman spectra of the drug, polymer and microparticles having different drug:polymer ratios (w/w): sample III (1:1) and sample IV (2:1).

As can be observed, the initial concentration of drug which contributed to the burst release (parameter  $A$ ) ranged from  $\sim 51\%$  ( $A = 0.506 \pm 0.036$ ) for sample IV to  $\sim 79\%$  ( $A = 0.792 \pm 0.007$ ) sample V. Additionally, the burst rate constants were higher for microparticles II, III and V, spanning between 0.503 and 0.556 min<sup>-1</sup>. The burst phase rate constants for the slowest microparticles IV and I were  $0.376 \pm 0.063$  and  $0.479 \pm 0.044$  min<sup>-1</sup>, respectively.

Surprisingly, the lowest burst release ( $\sim 51\%$ ) was observed for the microparticles containing 2:1 (w/w) drug:polymer ratio (sample IV). Drug release patterns from these microparticles progressed slowly reaching  $86.7 \pm 1.5\%$  of the drug released after 3 h. Additionally, the sample containing the highest polymer content (sample I) also showed decreased burst release ( $\sim 64\%$ ), with  $86.6 \pm 1.7\%$  of the drug being released after 3 h. Other microparticles (samples II, III and V) were

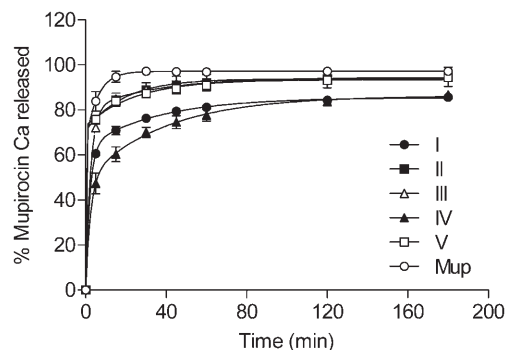


Figure 6. *In vitro* drug release profiles of the microparticles prepared from different drug:polymer ratios (w/w) (samples I-V) in comparison to drug. Data are the mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). In some cases, the error bars are within the size of data point.

characterised by extremely high burst release too deficient to provide adequate controlled release pattern.

The increased polymer weight ratio (sample I) was expected to result in decreased drug release (Al-Zoubi et al., 2008) due to its water-insoluble nature, but these microparticles still presented high burst release ( $\sim 64\%$ ). Solid-state characterisation revealed that the drug was amorphous and fully dispersed within the polymer matrix. Conversion of the drug into its amorphous form promoted drug solubility ( $>95\%$  of drug dissolved within 5 min), which is not favourable for the preparation of a controlled-release system and could have impact on burst release to a certain extent. However, it was assumed that the dissolution medium would not be able to approach drug molecules rapidly if the drug was enveloped or incorporated within a polymer matrix that is insoluble and low permeable. However, this theory was not proven by the results. Possible reason could be found in polymer deposition kinetics. Bain et al. (1999) and Yeo and Park (2004) described that under conditions of rapid

microdroplet desolvation, abrupt polymer precipitation results in low polymer density. Polymer chains do not have enough time for the controlled deposition, and the less dense matrices are formed despite the apparent pore-free nature of all samples examined by SEM. Low polymer density allows dissolution medium to enter and boost drug release. The wrinkled and folded morphology of these microparticles additionally supported the hypothesis that polymer deposition process was rapid and insufficient to make an appropriate matrix.

The microparticles containing a drug:polymer ratio of 2:1 (w/w) (sample IV) created a release pattern that was unexpected. The reduced burst (~51%) and overall drug release profile followed by incomplete drug release from microparticles after 3 h indicated that the polymer matrix formed under examined experimental conditions was superior with regard to the others. These microparticles were amorphous in nature, with no apparent crystallisation. Spectroscopic analyses (FT-IR and FT-Raman) revealed the existence of a molecular solid dispersion of drug and polymer, without the presence of a separate amorphous drug phase. There was no interaction between the drug and polymer that might have decreased drug solubility and interfered with the release process. In addition, the particle size distribution results and SEM images have shown that these microparticles were the smallest in size, contrary to the observed release data. The smooth surfaces and the extremely regular spherical forms of these microparticles indicated that the particles were probably formed slowly and later in drying process (Wang and Wang, 2002). A certain likelihood existed that the solidification process influenced drug release properties also. We assume that lower polymer loading decreased its initial saturation that, in turn, postponed matrix formation in droplet drying and enabled a better arrangement of polymeric chains.

Additional experiments were conducted to test our hypothesis and broaden the understanding of particle formation by varying inlet temperature and feed concentration to alter particle solidification process.

#### *Influence of inlet temperature and feed concentration on microparticle performance*

Inlet temperature directly influences evaporation process which determines droplet surface recession rate and strongly affects particle morphology (Vehring et al., 2007). The evaporation of spray dried droplet commences with solvent removal at nearly a constant rate and constant droplet surface temperature, as long as its outer layer is saturated with solvent continuously supplied from the droplet interior. This step is followed by a decline in the removal rate due to increased resistance to mass transfer within the solidifying particle. Consequently, the rate of heat transfer exceeds the rate of mass transfer causing an increase in particle surface (and interior) temperature. When a much higher inlet temperature is used, what results is a rapid formation of the dried outer layer, significantly

reducing period of constant drying rate. This submits the microparticle to the higher surface temperature than when lower inlet temperature is used (Masters, 1985).

The feed concentration, on the other hand, determines the initial saturation of microdroplet constituents, causing an earlier or later solidification onset. The feed concentration is also closely related to microparticle size.

#### *Drug loading, morphology and particle size*

Production yield was between 54% and 65% for inlet temperature and feed concentration experiments. Drug loading was consistent with theoretical values for all microparticles (Tables 2 and 3). SEM images (Figure 7) of drug-loaded microparticles prepared with a drug:polymer ratio of 2:1 (w/w) at inlet temperature ranging between 70°C and 110°C have shown essentially identical morphologies, with smooth particles surfaces, no pores or deformations. Temperature variation and consequent change of evaporation rate have not had a crucial impact on the particle outward appearance. The particle size analysis results suggest that particles were of comparable size, with a mean spherical diameter of 1.7–2.5 µm (Table 2).

Microparticles prepared from 1% (w/w) feed solution (sample IV-1%) are highly fused and agglomerated (Figure 8(a)). These agglomerates were mainly formed during drying; microparticles deviated from being spherical in shape probably due to the collision of microdroplets in drying cylinder. It is assumed that fine droplets that were formed after atomisation had very low solid content and low viscosity, resulting in fragile air-solution boundary that allowed particles to deform. Other samples prepared from different feed concentrations ranking from 2% to 5% (w/w) (Figures 8(b)–(d)) showed similar spherical morphology and smooth surfaces. Visually bigger individual particles were formed when more concentrated solutions were spray dried (Elversson et al. 2003; Elversson and Millqvist-Fureby, 2005), although all microparticles were of similar size (Table 3). Increased concentration of solutes in the microdroplets favoured earlier formation of the solid surface (solidification point was reached earlier), which discontinued further droplet surface recession and shrinkage. In addition, the higher solid content increased the viscosity of the feed solution as well (data not shown), which, in turn, resulted in bigger droplets created in the atomisation process and formed the bigger particles.

#### *Solid-state characterisation of microparticles*

X-ray diffractograms of microparticles produced at different inlet temperatures and from different feed concentrations confirmed the amorphous nature of the drug without noticeable crystallisation. For the same samples, FT-IR analyses were essentially the same (data not shown).

A trend of decreasing glass transition temperature is evident when inlet temperature is lowered (Table 2). The glass transition temperatures of samples IV-110 and IV-70 significantly differed ( $p < 0.05$ ), while other results do not show statistical differences ( $p > 0.05$ ) among each other (Table 2). It is also apparent that higher solvent



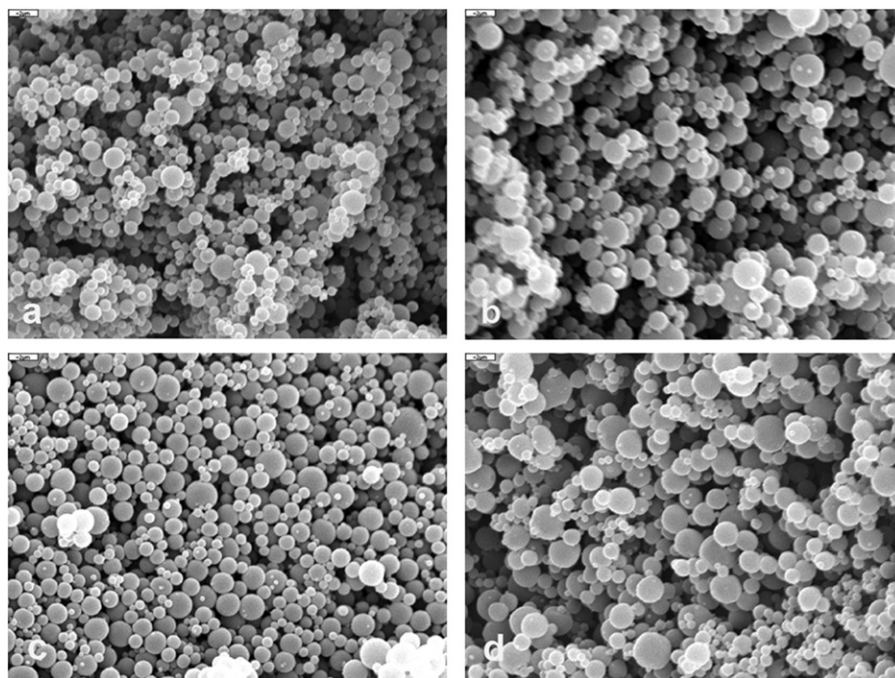


Figure 7. SEM images of microparticles having drug:polymer ratio 2:1 (w/w) prepared from 3% feed solution at different temperatures: (a) IV-110; (b) IV-90; (c) IV-80; and (d) IV-70.

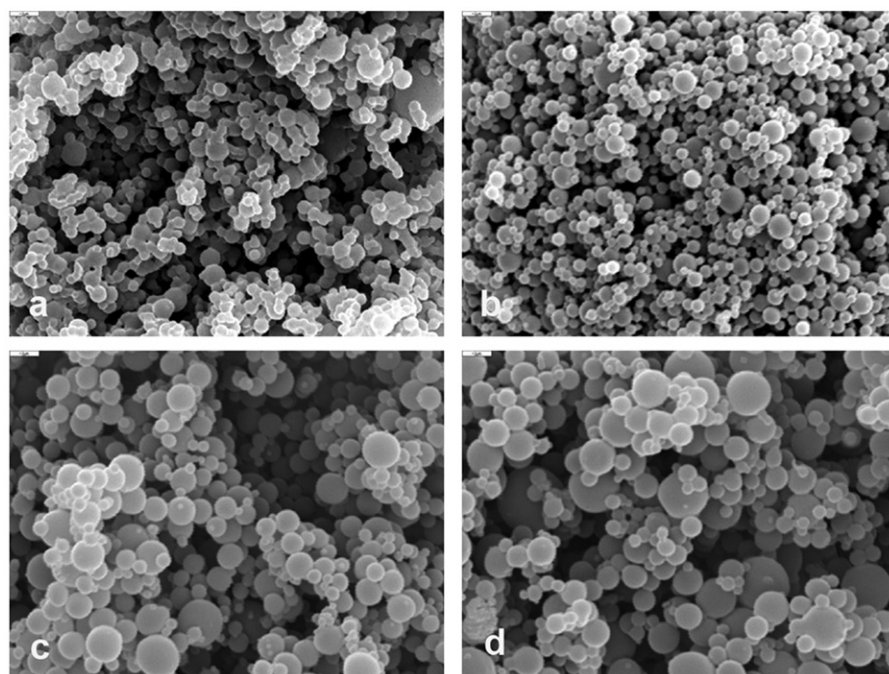


Figure 8. SEM images of microparticles having drug:polymer ratio 2:1 (w/w) spray dried at 100°C from different feed solutions: (a) sample IV-1%; (b) sample IV-2%; (c) sample IV-4%; and (d) sample IV-5%.

residues were associated with lower  $T_g$  values, suggesting that residual solvent could provide a plasticising effect to microparticles (Table 2). For the microparticles obtained by spray drying of different feed solutions at 100°C, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the glass transition temperatures (Table 3). Solvent residues were present at the highest level ( $\sim 1.6\%$ , Table 3) in the sample prepared from the most concentrated feed

solution (IV-5%). Once again, the highest residual solvent value was related to the lowest glass transition temperature ( $63.1 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ) obtained for the sample IV-5% (Table 3).

#### *In vitro drug release study*

Regarding the modelling of the drug release profiles, the best fit was the biexponential equation for all

microparticles (Table 4). The burst drug release decreased significantly ( $p < 0.05$ ) from  $\sim 51\%$  ( $A = 0.506 \pm 0.036$ , sample IV-100) to  $\sim 32\%$  ( $A = 0.321 \pm 0.029$ , sample IV-110) when the inlet temperature was raised from  $100^\circ\text{C}$  to  $110^\circ\text{C}$  (Figure 9). It is also evident that at lower inlet temperatures, specifically  $90^\circ\text{C}$ ,  $80^\circ\text{C}$  and  $70^\circ\text{C}$ , burst release increased up to  $\sim 76\%$  ( $A = 0.761 \pm 0.005$ ),  $\sim 79\%$  ( $0.786 \pm 0.010$ ) and  $\sim 72\%$  ( $A = 0.724 \pm 0.007$ ), respectively. The burst rate constant for sample IV-110 reached the lowest value of  $0.346 \pm 0.061 \text{ min}^{-1}$ . However, a significant difference ( $p > 0.05$ ) was not confirmed between microparticles prepared at  $100^\circ\text{C}$  and  $110^\circ\text{C}$  when burst rate constants were compared.

Results suggest that the inlet temperature affected burst release and the overall release profile; higher temperature favoured lower drug release. As previously depicted, a certain trend in the thermal properties was noticed and requires further consideration. The effect of temperature on a microparticle during its lifetime in a drying chamber has been thoroughly considered. The higher inlet temperature (much higher than the boiling point of solvent) induced more rapid solvent evaporation that enabled the onset of rapid solidification. The droplet lifetime was dramatically reduced, and, under an equal aspirator setting, microparticles prepared at a higher temperature existed for a longer period of time in a more heated environment inside the drying chamber. Temperature affected the physical properties of the solidifying polymer matrix, enhancing molecular mobility when increased over the glass transition temperature. For amorphous polymers, greater chain mobility enables relaxation processes to happen, resulting in reduced free volume and increased density (Craig et al., 1999). It is assumed that such thermal treatment may improve matrix density by allowing necessary configurational changes to occur (Azarmi et al., 2002). Additionally, lower solvent residues observed in these microparticles (sample IV-100 and IV-110) reduced the plasticising effect of solvent. Such matrices are characterised by increased intermolecular forces along the polymer chains, which could create a denser polymer matrix. All these events could limit dissolution medium penetration and slow down drug release. A similar observation of decreased drug release for biodegradable microparticles at higher inlet temperatures due to increased particle density has already been reported by Fu et al. (2001). In contrast, microparticles spray dried at inlet temperatures below  $100^\circ\text{C}$  (samples IV-90, IV-80 and IV-70) have not resulted in the rubbery state being glassy earlier in the drying process (see outlet temperatures, Table 2), which prevents molecular rearrangement and densification to occur even though evaporation rate was slower. This hypothesis is in agreement with the trend observed for the glass transition temperatures of corresponding microparticles, even though the differences between results are not statistically significant. Drug diffusion pathways in microparticle systems are extremely shortened in comparison to macroscopic controlled-delivery systems. Any deviation in matrix formation could be easily observed in prominent burst release; therefore, even small changes of

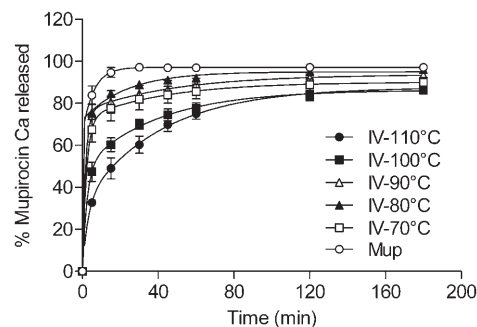


Figure 9. *In vitro* drug release profiles of microparticles having drug: polymer ratio 2:1 (w/w) prepared from 3% feed solution at different temperatures (samples IV-110, IV-100, IV-90, IV-80 and IV-70) in comparison to drug. Data are the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). In some cases, the error bars are within the size of data point.

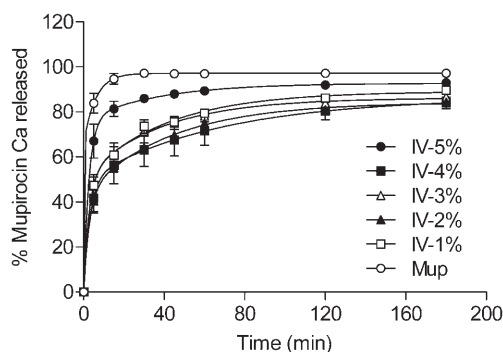


Figure 10. *In vitro* drug release profiles of microparticles having drug: polymer ratio 2:1 (w/w) spray dried at  $100^\circ\text{C}$  from different feed solutions (samples IV-1%, IV-2%, IV-3%, IV-4% and IV-5%) in comparison to drug. Data are the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). In some cases, the error bars are within the size of data point.

glass transition temperature associated with the particle density (Bouissou et al., 2006) should be carefully evaluated.

*In vitro* drug release profiles obtained for microparticles spray dried from different feed solutions are shown in Figure 10. Again, the best fitting for all microparticles was achieved with the biexponential model (Table 4). Initial burst release obtained for the microparticles prepared from 5% (w/w) (sample IV-5%) solution approached 76% ( $A = 0.759 \pm 0.010$ ) and was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in regard to all the other samples that remained between 43% and 50%. The burst rate constant ( $k_1 = 0.424 \pm 0.017 \text{ min}^{-1}$ ) of the microparticles prepared from 5% (w/w) (sample IV-5%) solution was higher in regard to the burst rate constants obtained for all other samples that remained between 0.315 and  $0.380 \text{ min}^{-1}$ , but a significant difference has not been confirmed. Drug release profiles obtained for IV-1%–IV-5% microparticles (Figure 10) revealed that drug release changes nonlinearly with the increase in feed concentration. It was unaffected when the feed concentration increased from 1% to 4% (w/w), but it changed when concentration approached 5% (w/w).



Table 5. MBCs of mupirocin calcium and mupirocin calcium-loaded microparticles tested on *S. aureus* (ATCC 29213) ( $n=3$ ).

Sample	MBC ( $\mu\text{g/mL}$ ) 3 h	MBC ( $\mu\text{g/mL}$ ) 6 h	MBC ( $\mu\text{g/mL}$ ) 18 h
Mupirocin calcium	128	32	16
IV	128-256	64-128	16
IV-110	128-256	64-128	16
IV (drug released from microparticles)	128	32	16
IV-110 (drug released from microparticles)	128	32	16

Variation of feed concentration affects the timing of particle formation under equal processing conditions (Elversson and Millqvist-Fureby, 2005). Apparently, the solidification takes place earlier in the drying process when higher feed concentration is used (Lechuga-Ballesteros et al., 2008). Early onset of the particle formation due to higher initial saturation leaves less time for drying droplet to shrink its size and increase particle density. The microparticles are practically “frozen”, leaving polymer chains loosely packed (Yeo and Park, 2004). It appears that under examined spray drying condition, 5% (w/w) feed concentration had too high of an initial saturation inducing early solidification too deficient to obtain controlled release pattern. Additionally, early formation of outer layer entrapped more solvent within IV-5% sample (1.6%, Table 3). The presence of the solvent could plasticise polymer matrix contributing to the observed burst release. Nevertheless, morphological characteristics are frequently reported to be directly related to drug release profiles, but visually similar spherical microparticles exhibited significantly different drug release profiles in this study.

In summary, the inlet temperature and feed concentration experiments demonstrated that the particle formation process could be responsible for controlling drug release pattern initially observed for the samples containing drug:polymer ratio 2:1 (w/w) rather than formulation composition itself. The best control over mupirocin calcium release, with significantly decreased drug release, was obtained for microparticles having a 2:1 (w/w) drug:polymer ratio prepared at a 110°C inlet temperature from 3% (w/w) feed solution using a laboratory scale equipment. These microparticles deserve further evaluation as promising candidates for the development of topical controlled-release systems.

#### Antimicrobial activity

Antimicrobial activity of drug-loaded microparticles was compared with drug-free microparticles, drug released from the microparticles and drug alone. Microparticles IV and IV-110 were chosen for antimicrobial activity testing due to the most favourable drug release achieved. MIC was 0.125  $\mu\text{g/mL}$  for each tested sample upon 18 h of incubation. As expected, drug-free microparticles exhibited no antimicrobial activity. Moreover, MBCs were concentration- and time-dependent for all samples showing slow bactericidal activity (Table 5). MIC value was significantly lower than concentration needed to kill 99% of initially

inoculated bacteria after 18 h of incubation, which is in accordance with previously studied mupirocin bactericidal activity (Sutherland et al., 1985). After 3 and 6 h of incubation, MBCs were twofold higher for drug-loaded microparticles than for mupirocin calcium released from the microparticles or mupirocin calcium itself. Higher MBCs values originate from the slower drug release obtained from the polymer matrix that is in agreement with desired performance of delivery systems. However, potential usage of such systems in therapy requires adjustment of initial drug concentration needed to maintain appropriate drug levels on skin during prolonged time. After 18 h of incubation, MBCs were similar for all drug-containing samples. These results confirm that encapsulation of mupirocin calcium does not compromise its antibacterial activity.

## Conclusion

The preparation of microparticles for controlled drug release via spray drying is a complex task accompanied with challenges to overcome burst release. This research has shown that mupirocin calcium-loaded microparticles intended for controlled drug release could be obtained even with a high loading (~66% (w/w)) of readily soluble drug when appropriate spray drying conditions are achieved and polymer deposition kinetics allows appropriate matrices to be formed. Also, antimicrobial activity testing confirms that encapsulated drug preserves its antibacterial effectiveness. Drug loading solely is not a sufficient and reliable predictor of drug release pattern and should be evaluated in conjunction with corresponding processing parameters. Microparticles intended for controlled drug delivery necessitate the formation of well-formed (denser) matrices that could be tailored via appropriate spray drying processing, given that even small variations in the process may profoundly change delivery system performance. Initial saturation of drug and polymer as well as inlet temperature, were recognised as efficient tools to modulate the formation of proper polymer matrices.

## Acknowledgements

The authors thank PLIVA Croatia Ltd for financial support of this research. The authors also thank Mr Marjan Tudja for his kind support in SEM imaging, Mrs Nada Hulita-Košutić and Mr Tomislav Biljan for their help in XRPD analyses.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

## References

- Al-Zoubi N, Alkhatib HS, Bustanji Y, Aiedeh K, Malamataris S. Sustained-release of buspirone HCl by co spray-drying with aqueous polymeric dispersions. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008;69:735–42.
- Amrutiya N, Bajaj A, Madan M. Development of microsponges for topical delivery of mupirocin. *AAPS PharmSciTech*, 2009;10:402–9.
- Azarmi S, Farid J, Nokhodchi A, Bahari-Saravi SM, Valizadeh H. Thermal treating as a tool for sustained release of indomethacin from Eudragit RS and RL matrices. *Int J Pharm*, 2002;246:171–7.
- Bain DF, Munday DL, Smith A. Solvent influence on spray-dried biodegradable microspheres. *J Microencapsul*, 1999;16:453–74.
- Beck RC, Pohlmann AR, Hoffmeister C, Gallas MR, Collnot E, Schaefer UF, Guterres SS, Lehr CM. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007;67:18–30.
- Bouissou C, Rouse JJ, Price R, van der Walle CF. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: Remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res*, 2006;3:1295–305.
- Chen R, Okamoto H, Danjo K. Preparation of functional composite particles of salbutamol sulfate using a 4-fluid nozzle spray-drying technique. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2008;56:254–9.
- Cortesi R, Ajanji SC, Sivieri E, Manservigi M, Fundueanu G, Menegatti E, Esposito E. Eudragit microparticles as a possible tool for ophthalmic administration of acyclovir. *J Microencapsul*, 2007;24:445–56.
- Craig DQ, Royall PG, Kett VL, Hopton ML. The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: Glassy drugs and freeze dried systems. *Int J Pharm*, 1999;179:179–207.
- Dillen K, Vandervoort J, van den Mooter G, Ludwig A. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*, 2006;314:72–82.
- Elversson J, Millqvist-Fureby A. Particle size and density in spray drying-effects of carbohydrate properties. *J Pharm Sci*, 2005;94:2049–60.
- Elversson J, Millqvist-Fureby A, Alderborn G, Elofsson U. Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying. *J Pharm Sci*, 2003;92:900–10.
- Embil K, Nacht S. The Microsponge Delivery System (MDS): A topical delivery system with reduced irritancy incorporating multiple triggering mechanisms for the release of actives. *J Microencapsul*, 1996;13:575–88.
- Esposito E, Roncarati R, Cortesi R, Cervellati F, Nastruzzi C. Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: Influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharm Dev Technol*, 2000;5:267–78.
- Fu YJ, Mi FL, Wong TB, Shyu SS. Characteristic and controlled release of anticancer drug loaded poly(D,L-lactide) microparticles prepared by spray drying technique. *J Microencapsul*, 2001;18:733–47.
- Hadinoto K, Phanapavudhikul P, Kewu Z, Tan RB. Dry powder aerosol delivery of large hollow nanoparticulate aggregates as prospective carriers of nanoparticulate drugs: Effects of phospholipids. *Int J Pharm*, 2007;333:187–98.
- Hancock BC, Zografi G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci*, 1997;86:1–12.
- Janssens S, de Armas HN, Roberts CJ, van den Mooter G. Characterization of ternary solid dispersions of itraconazole, PEG 6000, and HPMC 2910 E5. *J Pharm Sci*, 2008;97:2110–20.
- Kawakami K, Sumitani C, Yoshihashi Y, Yonemochi E, Terada K. Investigation of the dynamic process during spray-drying to improve aerodynamic performance of inhalation particles. *Int J Pharm*, 2010;390:250–9.
- Kim EH-J, Chen XD, Pearce D. On the mechanisms of surface formation and the surface compositions of industrial milk powders. *Drying Technol*, 2003;21:265–78.
- Kristmundsdóttir T, Gudmundsson ÓS, Ingvarsdóttir K. Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying. *Int J Pharm*, 1996;137:159–65.
- Lechuga-Ballesteros D, Charan C, Stults CL, Stevenson CL, Miller DP, Vehring R, Tep V, Kuo MC. Trileucine improves aerosol performance and stability of spray-dried powders for inhalation. *J Pharm Sci*, 2008;97:287–302.
- Lionzo MI, Re MI, Guterres SS, Pohlmann AR. Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(epsilon-caprolactone) blends to control the release of a drug model. *J Microencapsul*, 2007;24:175–86.
- Mandal TK, Bostanian LA, Graves RA, Chapman SR, Idodo TU. Porous biodegradable microparticles for delivery of pentamidine. *Eur J Pharm Biopharm*, 2001;52:91–6.
- Masters K, 1985. *Spray drying handbook*. New York, USA: Halsted Press.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard. M7-A5*. Wayne, PA, NCCLS.
- Pignatello R, Vandelli MA, Giunchedi P, Puglisi G. Properties of tolmetin-loaded Eudragit RL100 and Eudragit RS 100 microparticles prepared by different techniques. *STP Pharm Sci*, 1997;7:148–57.
- Rassu G, Gavini E, Spada G, Giunchedi P, Marceddu S. Ketoprofen spray-dried microspheres based on Eudragit RS and RL: Study of the manufacturing parameters. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008;34:1178–87.
- Rattes ALR, Oliveira WP. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technol*, 2007;171:7–14.
- Sipos P, Szabó A, Erő s I, Szabó-Révész P. A DSC and Raman spectroscopic study of microspheres prepared with polar cosolvents by different techniques. *J Therm Anal Calorim*, 2008;94:109–18.
- Sutherland R, Boon RJ, Griffin KE, Masters PJ, Slocombe B, White AR. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985;27:495–8.
- Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res*, 2008;25:999–1022.
- Vehring R, Foss WR, Lechuga-Ballesteros D. Particle formation in spray drying. *J Aerosol Sci*, 2007;38:728–46.
- Wang S, Langrish T. A review of process simulations and the use of additives in spray drying. *Food Res Int*, 2009;42:13–25.
- Wang FJ, Wang CH. Sustained release of etanidazole from spray dried microspheres prepared by non-halogenated solvents. *J Controlled Release*, 2002;81:263–80.
- Ward A, Campoli-Richards DM. Mupirocin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 1986;32:425–44.
- Wiranidchapong C, Tucker IG, Rades T, Kulvanich P. Miscibility and interactions between 17 $\beta$ -estradiol and Eudragit® RS in solid dispersion. *J Pharm Sci*, 2008;97:4879–88.
- Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res*, 2004;27:1–12.

Publikacija 2.

RESEARCH ARTICLE

# Mupirocin calcium microencapsulation via spray drying: feed solvent influence on microparticle properties, stability and antimicrobial activity

Marjana Dürriegl<sup>1</sup>, Maja Lusina Kregar<sup>1</sup>, Anita Hafner<sup>2</sup>, Maja Šegvić Klarić<sup>2</sup>, and Jelena Filipović-Grčić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pliva Croatia Ltd, Research and Development, Zagreb, Croatia, and <sup>2</sup>University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

## Abstract

**Objectives:** The aim of this research was to design a controlled release, spray dried, mupirocin calcium-loaded microparticles (MP) with acrylic polymer and assess the influence of a feed solvent at preselected drug:polymer proportions (1:5 and 2:1 (w/w)) on the performance and stability of the prepared MP.

**Methods:** Physicochemical properties of MP were assessed using modulated differential scanning calorimetry (MDSC), and thermogravimetric analyses (TGA), Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray analyses and were correlated with drug release. Morphology and particle size were determined using low-angle laser light scattering and a scanning electron microscope. A time-kill assay was conducted on two strains of *Staphylococcus aureus* to evaluate the antimicrobial activity of MP.

**Results and discussion:** The MP formed solid dispersions without apparent drug crystallization. Drug-polymer miscibility, morphology, drug release and consequently antimicrobial activity were dependent on drug loading (DL) and the used solvent. The superior control of drug release from MP was achieved for the higher DL (2:1 (w/w) drug:polymer proportion) using solvents in the following order: methanol  $\approx$  methanol:ethanol (50:50, w/w) > isopropanol:acetone (40:60, w/w). Moreover, a time-kill assay performed on *S. aureus* (ATCC 29213) and methicillin-resistant *S. aureus* strains confirmed the prolonged release and preservation of antimicrobial activity of the microencapsulated drug. The physical aging of the solid dispersion after 10 months of storage had negligible impact on the MP performance.

**Conclusions:** Acrylic-based MP were confirmed as suitable microcarriers for prolonged drug release using a well-established spray drying technique, while solvent influence was strongly related to the DL employed.

**Keywords:** Mupirocin calcium, spray drying, solid dispersions, controlled release, microparticles, antimicrobial activity, stability

## Introduction

The spray drying technique has been used as a microencapsulation method, being able to create microparticles (MP) composed of drug and polymer that were previously dissolved, dispersed or emulsified in the appropriate aqueous or organic medium<sup>1</sup>. Pharmaceutical MP preparation using the spray drying process includes not only the removal of solvent and reduction of particle size, but also the generation of the particles that have a well-

defined morphology and physicochemical properties<sup>2</sup>. The encapsulation of a drug within a polymer allows for greater control of the pharmacokinetic behavior of the active molecule, maintaining a more appropriate level of the drug at the site of delivery<sup>3</sup>, especially where micron size is an advantageous feature (e.g., topical and ocular administration<sup>4,5</sup>).

It is well known that the feed composition and spray drying process determine the ultimate product

Address for Correspondence: Prof. Jelena Filipović-Grčić PhD, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia. Tel.: +38516394761; Fax: +38514612691. E-mail: jfilipov@pharma.hr.

(Received 13 February 2011; revised 01 April 2011; accepted 05 April 2011)

characteristics<sup>6,7</sup>. Specifically, the solvent used for the feed preparation influences several very important factors that greatly contribute to the final MP properties and performance. It affects the following: (i) polymer solubility as well as the conformation of its chains<sup>8</sup>; (ii) deposition kinetics under constant spray drying conditions that are related to the solvent evaporation rate (determined by the boiling point temperature and heat of vaporization<sup>9,10</sup>) and the initial saturation of constituents. The solvent has a tremendous impact on the MP morphology<sup>10–13</sup> and density, which are directly allied with drug release<sup>14</sup>. Polymer chains have different conformations depending on the ability of the solvent to solubilize the polymer<sup>13,14</sup>. The physical entanglements between polymer chains change in different solvents. In a good solvent, the polymer exhibits a random coil-expanded conformation, whereas in poor solvent and in dilute solution, the polymer chain collapses, producing a globular conformation. Moreover, in poor solvents, polymer-rich and polymer-depleted phases may occur<sup>15</sup>, influencing the possibility that the polymer will interact with the other constituents<sup>16</sup>. The solvent evaporation rate and deposition kinetics dictate the matrix coherence and the amount of strain stored in the system. Denser matrices restrict polymer chain mobility due to reduced free volume, simultaneously limiting medium penetration into the MP matrix<sup>14</sup>.

Spray drying frequently ends up in a final product of amorphous nature, which is prone to undergo structural relaxation during storage, characterized by enthalpy and volume reduction. Drug release from the MP could change upon storage due to the time and temperature dependant variation of the free volume<sup>17</sup>. The magnitude of the driving force that leads to structural relaxation is linked to the rate of particle formation and is affected by process parameters<sup>18</sup>. Literature reports for poly(lactic-co-glycolic)acid MP indicate that the manufacturing process, residual solvent level and the nature of the interaction between the drug and polymer affect the rate of structural relaxation<sup>18</sup>. Therefore, the conditions directly influencing particle formation (e.g., solvent, initial drug saturation) could be a source of variability in the burst release and may affect the stability of the drug release during storage<sup>17,18</sup>.

Esposito et al<sup>11</sup>, earlier evaluated the solvent influence on the morphological and dimensional properties of Eudragit® RS-based MP prepared by spray drying while Sipos et al<sup>19</sup>, examined its impact on thermal properties; however, no data on drug release were provided. Stability of such microsystems, in terms of evaluating changes caused by relaxation processes and other solid-state alterations, has not been previously examined. Therefore, we aimed to broaden the current understanding of solvent influence on the MP physicochemical properties, stability and performance.

This study is a continuation of our previous work on the spray dried Eudragit® RS-based MP with mupirocin calcium<sup>20</sup>. Mupirocin calcium, a topical antibiotic, exerts

antimicrobial activity by reversibly inhibiting isoleucyl-transfer RNA, thereby inhibiting bacterial protein and RNA synthesis<sup>21</sup>. It has excellent activity against susceptible strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* in the treatment of secondarily-infected traumatic skin lesions as well as against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) as an intranasal agent. Given that mupirocin was administered three-times daily, with the increased likelihood that this regular dosing regime would be omitted resulting in a reduced curing rate, prolonged release MP were considered in order to improve the therapy. Such MP could provide a prolonged release of the drug on the skin, thus administering the drug in a localized manner at the application site, while simultaneously reducing application frequency<sup>22</sup>.

The spray dried powders prepared from two different drug:polymer proportions (1:5 and 2:1 (w/w)) were evaluated in terms of drug loading (DL), yield, encapsulation efficacy, particle size, morphology and drug release. In addition, mathematical modeling was applied to separate burst and sustained phases of the drug release profiles. Solid-state properties were assessed using a number of appropriate and complementary analytical techniques such as powder X-ray diffraction (XRPD), thermogravimetric analyses (TGA), modulated differential scanning calorimetry (MDSC) and Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR). In addition, a time-kill assay was performed using *S. aureus* (ATCC 29213) and clinically isolated methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains at two concentrations in order to evaluate the antimicrobial activity of microsystems.

## Materials and methods

### Materials

Mupirocin calcium was kindly donated by Pliva Croatia Ltd., Zagreb, Croatia. Eudragit® RS 100 and Eudragit® RS 12.5 (12.5% (w/w) of polymer in a 40:60 (w/w) acetone:isopropanol mixture) were obtained from Evonik, Essen, Germany. Methanol and tetrahydrofuran (liquid chromatography grade), ammonium acetate (puriss p.a.) and potassium bromide (grade for infrared spectroscopy) were obtained from Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Sodium acetate trihydrate (puriss p.a.) was provided by Kemika, Zagreb, Croatia. Polysorbate 80 was procured from Uniquema, Merseyside, UK. Ultra pure water was used in all the experiments.

### Methods

#### Preparation of MP

MP were prepared by spray drying the solutions containing two different proportions of mupirocin calcium and Eudragit® RS polymer, namely 2:1 and 1:5 (w/w). These proportions were preselected based on preliminary work that was previously published<sup>20</sup>. Samples M and ME were prepared by dissolving Eudragit® RS 100 in methanol and methanol:ethanol (50:50, w/w) respectively, using an



ultrasonic bath until complete dissolution of the polymer was achieved. The polymer solution was then left for 24 h before the drug was added. Mupirocin calcium was easily dissolved in the polymer solution by gentle stirring and spray dried immediately. Samples AI were prepared using commercially available Eudragit® RS 12.5 solution in which acetone:isopropanol (40:60, w/w) was used as the solvent. The total amount of solid material in all feed solutions was 3.0% (w/w).

Spray drying was performed using a Büchi B-290 mini spray dryer (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) with the Inert Loop B-295, which enabled safe operation with organic solvents in a closed loop. Compressed nitrogen was used to disperse the liquid into fine droplets, which were consequently dried in the cylinder and deposited in the cyclone. Drying conditions are given as follows for all prepared samples: the temperature was 110°C, the aspirator setting was 85%, the pump flow rate was 40% and the compressed nitrogen flow rate was 670 NL/h. A small high-performance cyclone was used to increase the yield.

### Determination of the DL and encapsulation efficiency

The mupirocin calcium content in the MP was determined by the HPLC assay method described in the United States Pharmacopeia (USP), 31st edition, Suppl. 2, 2009. An appropriate amount of MP was dissolved in methanol by sonication in an ultrasonic bath (Julabo USR3, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany) for 30 min to obtain 0.1 mg/mL of mupirocin calcium. Samples were filtered through glass fiber prefilters (Acrodisc® GF 25 mm syringe filters with GF/0.45 GHP membrane, Pall, Bad Kreuznach, Germany) before drug determination. An HPLC system, which consisted of an Agilent 1100 Series instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector set at 230 nm, was used to perform the assay. The mobile phase, a degassed and filtered mixture of 0.1 M ammonium acetate and tetrahydrofuran in the ratio of 68:32, was used at a flow rate of 1 mL/min. The column (Zorbax Eclipse XDB C8 column 250 × 4.6 mm, particle size 5 µm, Agilent, Palo Alto, CA) suited with a guard column (Symmetry C8, particle size 5 µm, 3.9 × 20 mm, Waters, Dublin, Ireland) was operated at 35°C. The sample injection volume was 20 µL. The elution was isocratic and the run time was 10 min. All experiments were performed in triplicate.

DL was determined as a percent ratio (w/w %) of the drug present in the MP. Encapsulation efficiency (EE) was determined as a percent ratio (w/w %) of the actual drug content in MP and the amount of drug added (theoretical content). The yield was calculated by dividing the weight of MP by the total weight of the added ingredients (polymer and drug).

### Drug release study

The dissolution test was performed using a USP 31 Apparatus 2 paddle apparatus (PharmaTest type PTW S, PharmaTest Apparatebau GmbH, Hainburg, Germany).

A predetermined amount of MP containing 50 mg of the drug was placed into 500 mL of degassed pH 5.5 USP acetate buffer, and the temperature was maintained at 37 ± 0.5°C. The paddle speed was 20 rpm. Aliquots (5 mL) were withdrawn at predetermined time points and analyzed, according to the HPLC assay method described above. The withdrawn aliquots were replaced with fresh dissolution medium thermostated at 37°C. The sink condition of the drug was maintained in a given pH medium. All analyses were performed in triplicate.

### Particle size analysis

Measurements of particle size distributions (PSDs) of MP were obtained using a low-angle laser light scattering instrument, Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). Particles were dispersed using a Hydro 2000µP dispersion unit. MP were dispersed in tap water using several drops of 1% (w/w) polysorbate 80 solution as a dispersant. Obscuration was set between 8 and 15%, and the samples were pre-treated with internal ultrasound for 1 min at the 100% level. During measurement, the pump/stirrer was set at 2000 rpm, and ultrasound was applied continuously at 10%. The sizes that were quoted are average values of six measurements.

### Thermal analyses

MDSC analyses were carried out on a TA Instrument Q1000 Modulated DSC (TA Instruments, New Castle, DE) using aluminum hermetic pans with pierced lids (to allow for removal of residual solvent) with about 5 ± 2 mg of sample, under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min). The samples were heated at 5°C/min from 20 to 200°C, using modulation temperature amplitude of ±0.8°C and period of 60 s. The glass transition temperature ( $T_g$ ) was determined using the TA Universal Analyses 2000 software by extrapolating the linear portion of the DSC curve above and below the glass transition point and determining the midpoint temperature in the reverse heat flow curve. The analyses were performed in triplicate.

Thermogravimetric (TG) curves were obtained using a TGA-7 TG analyzer (Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT), using platinum pans with about 5 mg of sample, under a dynamic nitrogen atmosphere (35 mL/min) and at a heating rate of 10°C/min from 30 to 250°C. These analyses enabled the determination of the total amount of volatile substance (residual solvent). The analyses were done in triplicate.

### Infrared analyses

Infrared spectra were recorded on a Nicolet 6700 FTIR instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) equipped with a fast recovery deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector, working under Omnic software version 4.1. A spectral range of 400–4000 cm<sup>-1</sup>, resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and an accumulation of 32 scans were used in order to obtain good-quality spectra. A KBr disc

method was used with approximately 0.5% (w/w) sample loading.

### Scanning electron microscopy

The morphology of the MP was observed on a JEOL JSM-5800 scanning electron microscope (SEM) (JEOL, Tokyo, Japan). Samples were mounted on the double-sided adhesive and coated with a thin layer of gold under vacuum. The SEM was operated at an acceleration voltage of 15 kV.

### X-ray analyses

XRPD data were recorded on a Philips X'Pert PRO diffractometer (PAN Analytical, Kassel, Waldau, Germany) equipped with an X'Celerator detector ( $2.022^\circ 2\theta$ ) using  $\text{CuK}\alpha$  radiation at 45 kV and 40 mV. The scan angle range ( $2\theta$ ) was  $2\text{--}50^\circ$ , the step size ( $2\theta$ ) was  $0.017^\circ$  and the time per step was 50 s. Samples were powdered in a mortar and applied directly onto a Phillips' original circular sample holder (16 mm diameter) and closed with the bottom plate. Diffractograms were analyzed using X'Pert Data Collector software.

### Stability studies

MP stability was assessed after storage for 10 months at controlled room temperature ( $25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$ ) in glass containers. X-ray, MDSC and drug release analyses were conducted to evaluate the physical stability of the powders.

### Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of MP was investigated with respect to the free drug. Samples were suspended in degassed acetate buffer (pH 5.5; USP) immediately prior to examination. Antimicrobial activity was tested on *S. aureus* (ATCC 29213) and three clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). A two-fold microdilution assay using Mueller-Hinton broth (Sigma, Munich, Germany) was carried out following CLSI guidelines (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001). A  $1\text{--}2 \times 10^8$  colony-forming unit (cfu)/mL inoculum was prepared and adjusted to a final concentration of  $1\text{--}2 \times 10^5$  cfu/mL in broth containing samples in two-fold dilutions ranging from  $0.0625 \mu\text{g/mL}$  to  $64 \mu\text{g/mL}$  on a microtiter plate. A culture of *S. aureus*

strains in the broth was used as a positive (growth) control, while broth without *S. aureus* was used as a negative control. The minimal inhibitory concentration (MIC) was the lowest concentration that inhibited visible bacterial growth after 24 h of incubation at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Following MIC determination, a time-kill assay was performed using *S. aureus* (ATCC 29213) and a single *S. aureus* (MRSA) strain. A bacterial concentration between 6.1 and 6.5 log cfu/mL was used as the initial inoculum on a microtiter plate. Wells containing Mueller-Hinton broth with mupirocin calcium samples in concentrations of 16 and  $8 \mu\text{g/mL}$  were incubated with *S. aureus* strains for 3, 6 and 24 h at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . A minimal bactericidal concentration of  $16 \mu\text{g/mL}$  was previously determined for *S. aureus* (ATCC 29213<sup>20</sup>). After incubation, ten-fold dilutions were prepared with Mueller-Hinton broth and  $10\text{-}\mu\text{L}$  samples were subcultured on Mueller-Hinton agar plates. Bacterial colonies were counted after 18 h of incubation at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Experiments were performed in triplicate.

### Statistical analysis

Unless otherwise noted, the results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). A one-way analysis of variance was employed for the comparison of the experimental data. *Post hoc* multiple comparisons were done by Tukey's test for significance at *p*-values less than 0.05 ( $p < 0.05$ ). Mathematical modeling (monoexponential and biexponential equations) was applied to characterize drug release kinetics (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego, CA; www.graphpad.com). A biexponential model has been used to separate burst ( $k_1$  rate constant) and sustained release phases ( $k_2$  rate constant) of dissolution profiles to enable their comparison<sup>23,24</sup>.

## Results and discussion

### Solvent influence on the properties of the MP

#### Drug encapsulation, production yield, particle size and morphology

Characteristics of the spray dried MP, differing in DL and solvents used, are given in Table 1. Eudragit® RS solubility in organic solvents was experimentally observed and found to increase in the following order: methanol

Table 1. Characteristics of the MP containing 1:5 and 2:1 (w/w) drug:polymer proportions spray dried from methanol, methanol:ethanol and acetone:isopropanol mixtures.

Samples	Drug:polymer proportion (w/w)	Solvent/s	EE [% $\pm$ SD] ( <i>n</i> =3)	DL [% $\pm$ SD] ( <i>n</i> =3)	Yield (%)	RS [% $\pm$ SD] ( <i>n</i> =3)	PSD [ $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ] ( <i>n</i> =6)		
							d(0.1)	d(0.5)	D(0.9)
M1	1:5	MeOH	$102.3 \pm 1.1$	$16.1 \pm 0.2$	55.8	$0.9 \pm 0.0$	$1.4 \pm 0.0$	$2.8 \pm 0.1$	$7.0 \pm 0.2$
ME1	1:5	MeOH:EtOH = 50:50(w/w)	$99.1 \pm 0.9$	$15.6 \pm 0.1$	56.0	$1.0 \pm 0.2$	$3.4 \pm 0.1$	$7.6 \pm 0.2$	$23.6 \pm 0.0$
AI1	1:5	Acetone:iPrOH = 40:60(w/w)	$99.6 \pm 0.6$	$15.2 \pm 0.1$	62.6	$1.3 \pm 0.1$	$2.6 \pm 0.0$	$5.7 \pm 0.0$	$13.6 \pm 0.0$
M2	2:1	MeOH	$101.5 \pm 0.6$	$63.8 \pm 0.3$	62.6	$1.0 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.0$	$3.1 \pm 0.0$	$10.1 \pm 0.2$
ME2	2:1	MeOH:EtOH = 50:50(w/w)	$99.1 \pm 0.8$	$62.4 \pm 0.5$	62.7	$1.6 \pm 0.0$	$2.0 \pm 0.0$	$3.7 \pm 0.0$	$6.9 \pm 0.0$
AI2	2:1	Acetone:iPrOH = 40:60(w/w)	$99.0 \pm 0.6$	$61.1 \pm 0.4$	65.8	$2.2 \pm 0.1$	$4.1 \pm 0.0$	$9.5 \pm 0.0$	$21.5 \pm 0.3$

MeOH, methanol; EtOH, ethanol; iPrOH, isopropanol; EE, encapsulation efficacy = percent ratio (w/w %) of the actual drug content in MP and the amount of drug added (theoretical content); DL, drug loading = percent ratio (w/w %) of the drug present in the MP; RD, residual solvents; SD, standard deviation; PSD, particle size distribution.

< methanol:ethanol < acetone:isopropanol. The drug exhibited the opposite order of solubility in regards to the polymer. Irrespective of the solvent used, good encapsulation was achieved for all the MP obtained (EE > 99%; Table 1). There is a high likelihood that the microdroplets formed during atomization will retain their initial composition once they become solid, if they are originally in solution form. These findings are aligned with observations of complete drug encapsulation that was attained by the spray drying process from the feed solution, which were described previously<sup>25–27</sup>. Production yield was generally high for all MP, ranging between 56 and 66% (Table 1).

MP were in the form of white, free-flowing powder (Figure 1). The solvent had a great influence on MP morphology<sup>9,12,28</sup>. Figure 1A–1C represents MP with a drug:polymer proportion of 1:5 (w/w). MP M1 (Figure 1A) were highly shriveled, suggesting that when methanol was used as the solvent, the early onset of the solidification process happened in the drying process, starting with the formation of a pliable layer that later underwent prominent deformation due to the increased interior solvent vapor pressure<sup>9,28</sup>. Methanol:ethanol and acetone:isopropanol mixtures enabled the generation of rather spherical MP, with smooth surfaces and no visible pores (ME1; Figure 1B and AI1; Figure 1C, respectively). Smooth surfaces are often present when a polymer solidifies at a temperature that is high enough to maintain the polymer in the rubbery state (outlet temperatures were between 56 and 69°C), allowing necessary relaxation processes to occur<sup>26</sup>. Ethanol, having a higher boiling point than methanol and being a better solvent for polymer, possibly affected the drying process by slowing down the evaporation rate and delaying solidification. The microdroplet had more time to shrink in size and gradually solidify, thus preserving its spherical shape. An acetone:isopropanol mixture further improved the polymer solubility that again produced sphere-shaped MP without an early surface deposition (and consequential

modification of morphology). It is believed that the polymer had a predominant influence on the particle morphology as the DL was at a 15–16% (w/w) level in the associated samples.

Figure 1D–1F represents MP having a drug:polymer proportion of 2:1 (w/w). M2 (Figure 1D) and ME2 (Figure 1E) MP have a regular spherical shape and a smooth and poreless surface. Methanol and methanol:ethanol mixtures allowed the solidification process to happen slowly, resulting in a uniform outward appearance. On the contrary, the acetone:isopropanol mixture significantly reduced the drug solubility while acting as an excellent solvent for the polymer at the same time. Thus, it was expected that the drug would reach its saturation point before the polymer for AI2 MP. These MP (Figure 1F) are not perfectly spherical. Microdroplet coalescence probably happened in close proximity to the atomizer, initiated by extremely rapid drug deposition, thus forming distorted and agglomerated MP.

The PSD results are presented in Table 1. Generally, the small particle sizes ( $d(0.9)$  in the range of 7–22  $\mu\text{m}$ ) of all MP may be attributed to the relatively low viscosity of the spraying solution (low concentration of solutes) and high compressed nitrogen flow rate. If PSD results are interpreted mutually with SEM images, it is easily recognized that particles are smaller than the measured volume distributions (see  $d(0.9)$  values, Table 1). The higher  $d(0.9)$  values could be attributed to the agglomerated MP rather than to the actual size of a single particle.

#### Solid-state characterization

X-ray analyses (Figure 2) have shown composition-dependant halo patterns that are characteristic of highly disordered amorphous forms without diffraction peaks of crystalline mupirocin calcium. However, owing to the low sensitivity of the X-ray technique that was used, there is still a possibility that a very small fraction of crystalline drug is present within the polymer matrix.

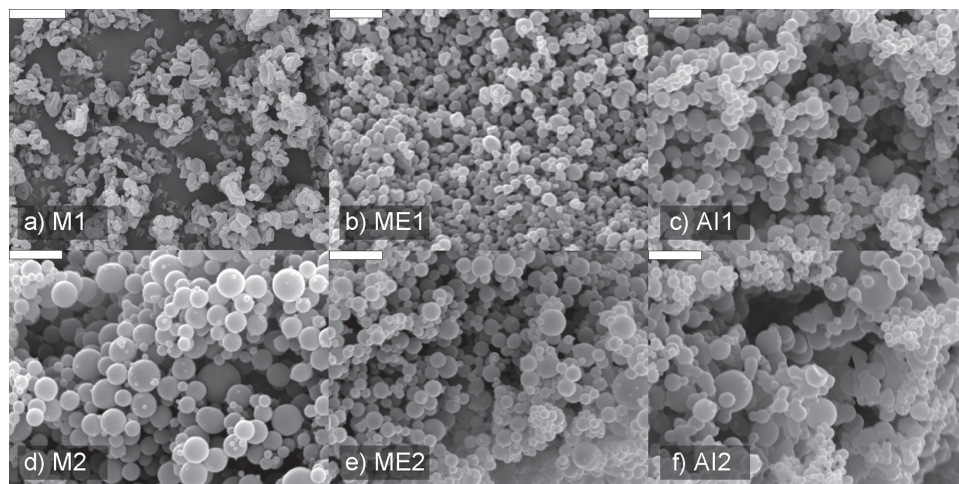


Figure 1. SEM images of the MP: (A) M1, (B) ME1 and (C) AI1 containing 1:5 (w/w) drug:polymer proportions and (D) M2, (E) ME2 and (F) AI2 containing 2:1 (w/w) drug:polymer proportions (size bar denotes 5  $\mu\text{m}$ ).



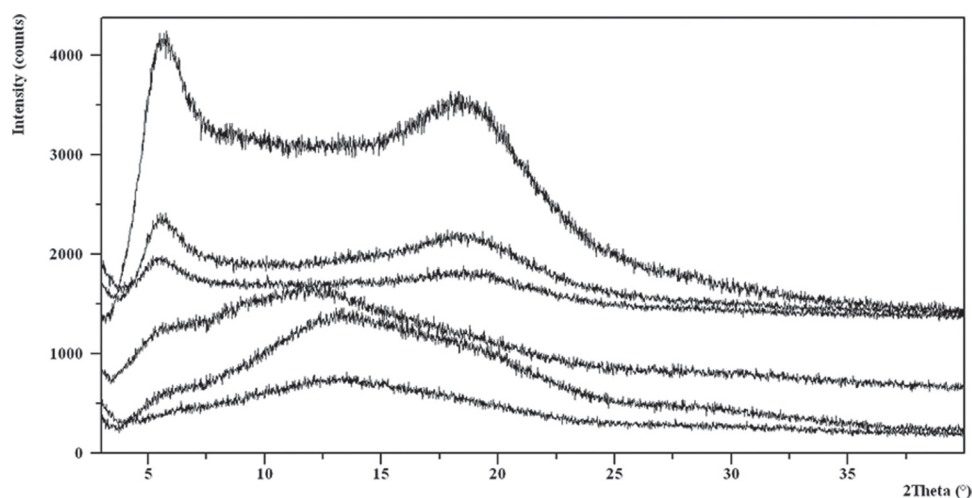


Figure 2. X-ray diffractograms of the MP (from the bottom to the top): (A) M1; (B) ME1; (C) AI1; (D) M2; (E) ME2 and (F) AI2.

Thermal properties are an extremely useful tool in revealing the solid-state form of a drug that is embedded into the polymer matrix, enabling a better understanding of overall MP performance. It also indicates the organization and flexibility of polymer chains that are directly linked to the rate of drug release<sup>29</sup>. The individual thermal properties of the drug and polymer are previously reported in our work<sup>20</sup>. Thermograms of MP containing a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion are depicted in Figure 3A. The total heat flow curves generated by MDSC have shown a lack of melting endotherm of mupirocin calcium, which is expected at 133°C (data not shown), assuming an amorphous nature for the obtained systems. These findings were additionally confirmed by the X-ray data (Figure 2). Further, the reverse heat flow curves were utilized to deconvolute the thermal events associated with specific heat that is characteristic for glass transition. A single, primary  $T_g$  value has been observed for all MP that indicated the formation of a homogeneous amorphous solid dispersion exhibiting single-phase character<sup>30</sup>. The well-known Gordon-Taylor (GT) equation is nowadays extensively exploited for the prediction of binary mixture behavior based on the free volume theory. It recognizes non-idealities of mixtures in terms of specific drug-polymer interactions or immiscibility issues<sup>31</sup>. Detailed principles underlying this approach are described elsewhere in the literature<sup>31,32</sup> and will not be reported here. However, the calculated GT prediction of the glass transition temperature for a drug:polymer proportion of 1:5 (w/w) was 59.5°C if density differences are neglected. MDSC curves have revealed that different solvents produced solid dispersions of diverse thermal properties that are reflected in altered glass transition temperatures. When methanol was used as a solvent, it yielded MP (M1) with the lowest glass transition temperature (58.4 ± 2.2°C), whereas MP prepared from methanol:ethanol (ME1) and acetone:isopropanol (AI1) mixtures produced solid dispersions with ascending  $T_g$  values of 63.4 ± 1.0°C and 68.7 ± 1.1°C, respectively. Such phenomena have already been reported by Al-Obaidi et al<sup>16</sup>, and was attributed to

diverse polymer chain conformations caused by different polymer affinities to the solvent. In this particular case, the highest  $T_g$  value was observed for the solvent system in which the polymer had the highest solubility. Higher  $T_g$  values, positively deviated from the GT prediction, indicate that more energy is required for these mixtures to pass through the glass transition; hence, relatively stronger intermolecular forces could be the cause of the positive deviation observed between measured and predicted  $T_g$  values<sup>33</sup>. It should be emphasized also that residual solvents increased from the lowest value for M1 (0.9%, Table 1) to the highest value for AI1 (1.3%, Table 1), so plasticization of the solvent residues could not be related with the observed glass transition temperatures.

FTIR spectra (Figure 4A) of the solid dispersions containing a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion were recorded in order to ascertain if any band shift divergence existed amongst the samples. The essentially identical spectra were obtained for the MP and their corresponding physical mixtures, thereby excluding drug-polymer interactions as a root cause of different thermal properties. However, the origin of a  $T_g$  increase could be possibly linked to different drug and polymer molecular packing being associated with the decreased free volume as previously reported by Tajber et al<sup>34</sup>, for polyvinylpyrrolidone-based solid dispersions.

Figure 3B represents thermograms of MP having a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion. The reverse heat flow curve of M2 and ME2 have shown a single thermal event at 68.1 ± 1.7°C and 66.7 ± 0.6°C, respectively. It confirmed the presence of a drug-polymer solid dispersion with no evidence of phase separation. The calculated GT prediction of the glass transition temperature for a drug:polymer proportion of 2:1 (w/w) was 69.3°C. In this case, GT predicted values corresponded well with experimentally observed glass transition temperatures. However, the reverse heat flow curve for MP prepared from the acetone:isopropanol mixture (AI2) was characterized with two consecutive thermal events appearing at ~61°C and ~68°C, respectively (Figure 3C). Thereby, phase separation being manifested

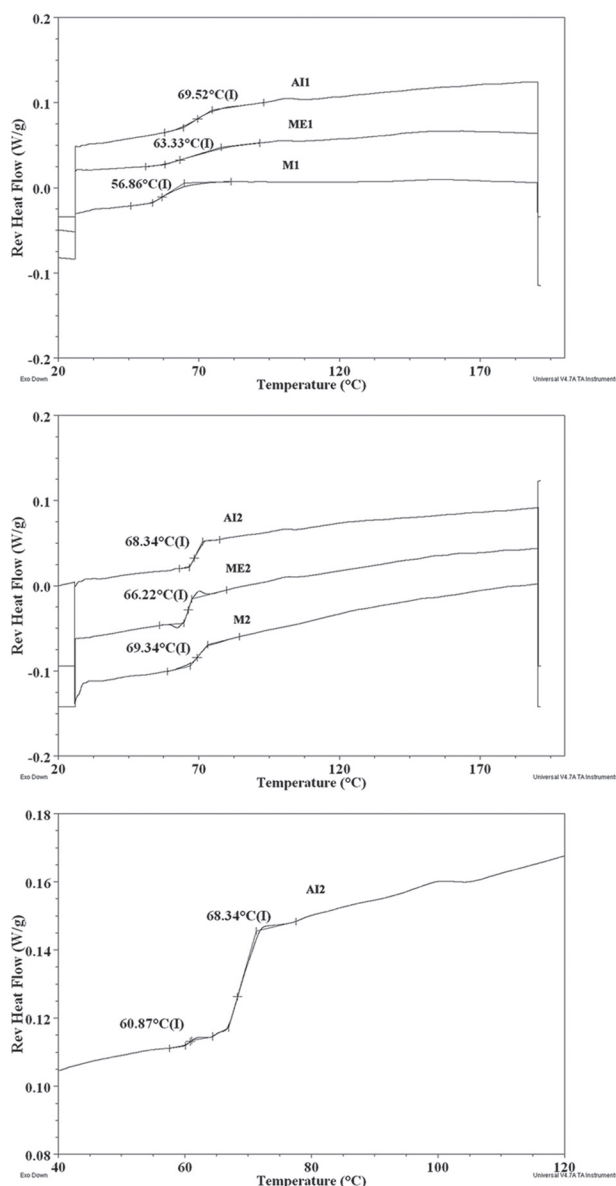


Figure 3. Reverse heat flow curves of the MP: (A) M1, ME1 and AI1 with a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion; (B) M2, ME2 and AI2 with a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion; (C) zoomed reverse heat flow curve of the AI2 MP.

in two separate glass transition temperatures was verified. Evidently, different solvent systems induced the formation of solid dispersions with different levels of drug mixing with the polymer, under identical compositional and spray drying conditions. Such behavior could be ascribed to poor drug solubility in the particular solvent mixture. Given that drug solubility was tremendously reduced, its high initial saturation could have forced early drug deposition whilst polymer saturation has not yet been achieved in the drying droplet. It is evident that one of the preconditions to achieve simultaneous deposition of drug and polymer is to have similar solubility of both constituents in the common solvents. Janssens et al<sup>35</sup>, just recently demonstrated the importance of drying kinetics to drug-polymer miscibility, as different DLs were achieved when spray drying and film-casting methods were employed. Again, the highest

residual solvent level (2.2%, Table 1) was found in the MP prepared from the acetone:isopropanol mixture.

FTIR spectra (Figure 4B) of the solid dispersion containing a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion displayed indistinguishable spectral characteristics for the MP and the corresponding physical mixtures, confirming a lack of any interaction.

### Drug release behavior

Drug release profiles have shown a high burst release irrespective of the solvent used for the MP having a drug:polymer proportion of 1:5 (w/w) (Figure 5A). High burst release from the MP is extensively reported in the literature<sup>18,36</sup> and presents the major challenge in the development of the controlled release MP. It is described as uncontrolled drug release, which occurs immediately after MP come into contact with dissolution medium<sup>18</sup>, and is frequently attributed to the surface-associated or heterogeneously-distributed drug within the particle. It may also be caused by high porosity or low density of MP<sup>36</sup>. Moreover, the small length scale associated with MP supports rapid release unless it is suppressed by a slow diffusion coefficient and low drug solubility<sup>2</sup>.

Drug release from MP was compared with crystalline and amorphous drug release patterns. Mono- and biexponential mathematical models were applied to characterize drug release patterns, and their fits were compared using an extra sum-of-squares F-test (Table 2). As the best fit was attained using a biexponential model, existence of a distinct burst and sustained phases of drug release were proven for all MP. The burst release of samples containing a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion ranged between  $62.8 \pm 3.6\%$  and  $69.7 \pm 2.0\%$  (A parameter, Table 2) with rate constants ranging between  $0.336 \pm 0.024$  and  $0.457 \pm 0.073 \text{ min}^{-1}$ , showing no significant difference among them ( $p > 0.05$ ).

One of the causes of the rapid initial burst release could be the change in the physical form of the drug, from the crystalline into the amorphous, which promoted its solubility. But, it is evident that MP achieved a slower drug release when compared with the amorphous drug (Figure 5A). Particle size difference had no major impact on drug release behavior of the MP having a drug:polymer proportion of 1:5 (w/w). Drug release profiles were not affected by the particle size even if MP M1 and ME1 are compared for which the most prominent size difference was observed. As previously reported by our group, fast drug release might have been supported by a rapid polymer deposition linked to high initial saturation. By varying feed solvents, we intended to increase polymer solubility and delay its solidification. This variation, however, resulted in modified physical properties but has not provided significant improvement in prolonging drug release. Even though the glass transition temperature was higher for the MP prepared from the acetone:isopropanol mixture, presuming denser matrices (as no stronger drug-polymer interaction was proven), it has not provided a slower drug release. It is possible that the decrease of

drug solubility in a solvent that promoted polymer solubility was an obstacle to achieving better release control. Lower drug solubility could have induced earlier deposition, resulting in surface drug-enriched regions. It is

eventually important to inhibit fast deposition of either component if a prolonged release pattern is desired. The MP having a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion gave different dissolution patterns as shown in

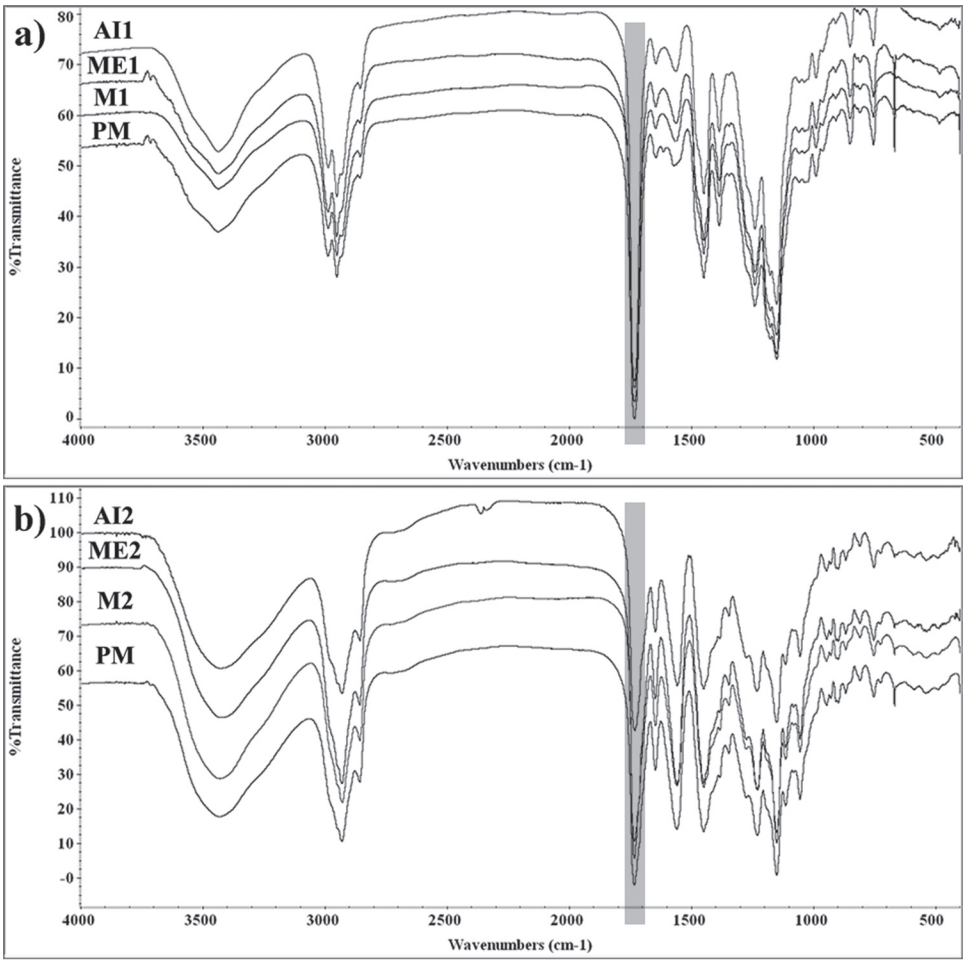


Figure 4. FTIR spectra of the MP: (A) M1, ME1, AI1 and physical mixtures (PM) with a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion and (B) M2, ME2, AI2 and physical mixtures (PM) with a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion.

Table 2. Mathematical modelling parameters of mupirocin calcium release from the MP containing 1:5 and 2:1 (w/w) drug:polymer proportions spray dried from methanol, methanol:ethanol and acetone:isopropanol mixtures (initially and after storage for 10 months at 25°C/60%RH).

Sample	Monoexponential model $Q=a(1-e^{-kt})$			Biexponential model $Q=A(1-e^{-k_1t})+B(1-e^{-k_2t})$				
	$R^2$	$a$ (% $\pm$ SEM)	$k$ ( $\text{min}^{-1} \pm$ SEM)	$R^2$	$A$ (% $\pm$ SEM)	$k_1$ ( $\text{min}^{-1} \pm$ SEM)	$B$ (% $\pm$ SEM)	$k_2$ ( $\text{min}^{-1} \pm$ SEM)
M1	0.980	$78.3 \pm 1.0$	$0.270 \pm 0.024$	0.996 (0.994)	$62.8 \pm 3.6$ ( $50.3 \pm 5.2$ )	$0.457 \pm 0.073$ ( $0.550 \pm 0.038$ )	$19.5 \pm 4.9$ ( $23.4 \pm 6.6$ )	$0.033 \pm 0.008$ ( $0.038 \pm 0.010$ )
ME1	0.982	$83.8 \pm 1.0$	$0.286 \pm 0.025$	0.998 (0.996)	$69.7 \pm 2.0$ ( $57.6 \pm 7.0$ )	$0.455 \pm 0.044$ ( $0.640 \pm 0.051$ )	$19.0 \pm 3.0$ ( $25.8 \pm 8.1$ )	$0.027 \pm 0.005$ ( $0.051 \pm 0.012$ )
AI1	0.990	$85.1 \pm 0.8$	$0.220 \pm 0.013$	0.999 (0.974)	$67.3 \pm 3.4$ ( $54.7 \pm 11.2$ )	$0.336 \pm 0.024$ ( $0.422 \pm 0.033$ )	$20.7 \pm 4.0$ ( $37.6 \pm 14.7$ )	$0.042 \pm 0.007$ ( $0.033 \pm 0.013$ )
M2	0.954	$82.7 \pm 2.4$	$0.047 \pm 0.006$	0.991 (0.991)	$31.8 \pm 5.3$ ( $44.4 \pm 6.5$ )	$0.348 \pm 0.113$ ( $0.423 \pm 0.036$ )	$55.8 \pm 7.7$ ( $34.8 \pm 8.3$ )	$0.024 \pm 0.003$ ( $0.036 \pm 0.008$ )
ME2	0.941	$75.6 \pm 2.2$	$0.062 \pm 0.009$	0.993 (0.997)	$37.2 \pm 3.9$ ( $39.5 \pm 3.3$ )	$0.336 \pm 0.076$ ( $0.552 \pm 0.033$ )	$45.3 \pm 6.1$ ( $44.6 \pm 4.6$ )	$0.022 \pm 0.003$ ( $0.030 \pm 0.003$ )
AI2	0.953	$85.1 \pm 1.8$	$0.119 \pm 0.016$	0.986 (0.996)	$45.5 \pm 9.9$ ( $76.6 \pm 1.8$ )	$0.434 \pm 0.193$ ( $0.505 \pm 0.005$ )	$44.9 \pm 12.3$ ( $24.3 \pm 18.1$ )	$0.037 \pm 0.009$ ( $0.030 \pm 0.006$ )

Q, percentage of drug released at time  $t$ ;  $k$ ,  $k_1$  and  $k_2$ , rate constants;  $a$ , plateau value;  $A$  and  $B$ , the parameters which reflect the portion of the released drug that contributed to the burst and sustained phases, respectively;  $R^2$ , coefficient of determination; SEM, standard error; non-bracketed and bracketed values denote initial and 10-month stability data, respectively.

Figure 5B. Mathematical modeling confirmed that a biexponential model was more suitable for drug release as compared to a monoexponential model (Table 2). MP prepared from the methanol (M2) and methanol:ethanol mixture (ME2) displayed almost identical release patterns, with the burst releases ranging between  $31.8 \pm 5.3\%$  and  $37.2 \pm 3.9\%$  (A parameter, Table 2), respectively. MP prepared from the acetone:isopropanol mixture (AI2) were characterized with a higher initial release ( $45.5 \pm 9.9\%$ , Table 2) and a burst constant rate of  $0.434 \pm 0.193 \text{ min}^{-1}$ . Again, PSDs of MP having 2:1 (w/w) drug:polymer proportion cannot explain differences observed in drug release profiles. Smaller M2 and ME2 MP obtained slower drug release in comparison to the bigger and more agglomerated AI2 MP. It is assumed that due to altered drug-polymer miscibility in AI2 MP, certain amount of the drug was separated from the polymer matrix and was thus readily available for the dissolution process. This assumption could be supported by the thermal properties of the corresponding MP, for which phase separation was determined (Figure 3C). In addition, drug solubility in the acetone:isopropanol mixture was low, and its deposition started earlier in the drying process, which

stopped shrinkage of the microdroplets and precluded generation of a coherent matrix. Comparing the release profiles of M2 and ME2 MP with mupirocin calcium dissolution profiles, it is noticeable that MP provided remarkable control over drug release. Specifically, if the amorphous drug and above-mentioned MP (that contain amorphous drug within polymer matrix) are mutually considered, a substantially decreased drug release was accomplished.

### Physical stability of the MP

#### Solid-state characterization

X-ray diffractograms of the MP upon storage for 10 months at  $25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$  are provided in Figure 6. Clearly, crystallization cannot be observed and solid dispersions generated in the spray drying process remained amorphous during storage regardless of the drug:polymer proportion or the solvent used. However, it is not only the crystallization of drug that could deteriorate MP performance, but also any change in molecular structure including the distribution of the drug within the polymer.

Reverse heat flow curves of the MP with lower DL (1:5 (w/w) drug:polymer proportion) are given in

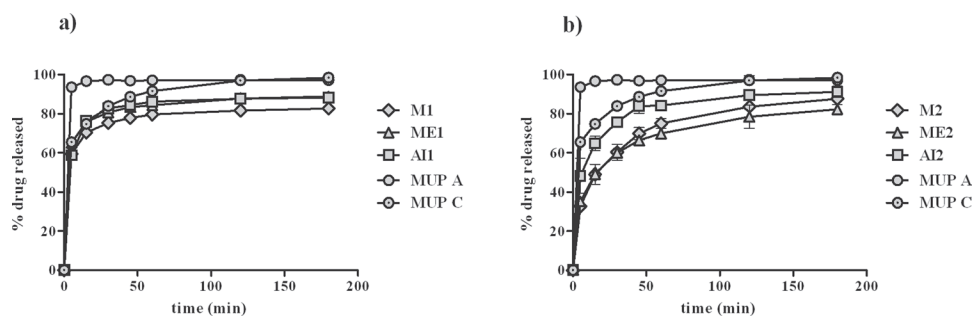


Figure 5. *In vitro* drug release profiles of the MP (A) M1, ME1 and AI1 with a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion and (B) M2, ME2 and AI2 with a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion in comparison to the drug (amorphous (A) and crystalline (C)). Data are the mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). In some cases, the error bars are within the size of the data point.

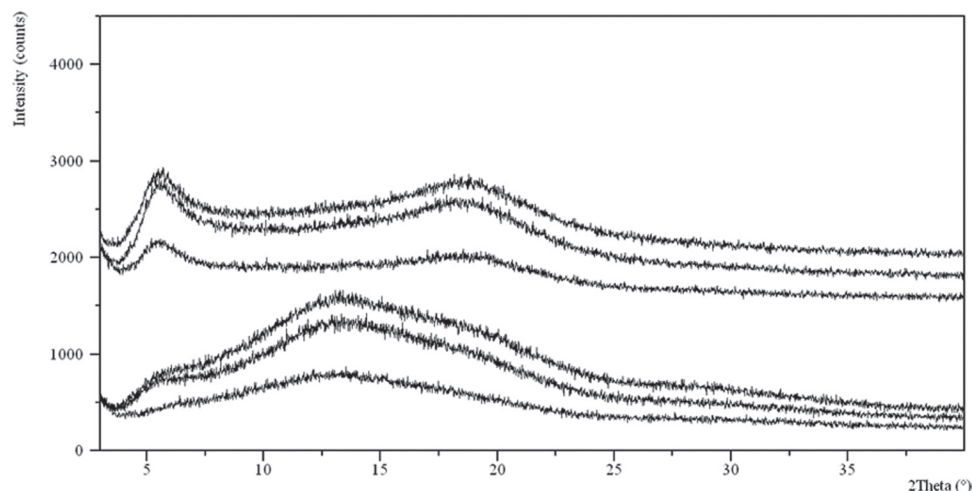


Figure 6. X-ray diffractograms of the MP after storage for 10 months at  $25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$  (from the bottom to the top): (A) M1; (B) ME1; (C) AI1; (D) M2; (E) ME2 and (F) AI2.



Figure 7A. All thermograms were characterized by a single glass transition event, but shifted slightly toward higher temperatures in comparison to the  $T_g$ s obtained at the beginning of the stability study. The glass transition temperatures for the M1, ME1 and AI1 MP were  $61.0 \pm 0.6^\circ\text{C}$ ,  $66.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$  and  $72.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$ , respectively. There was no evidence of a thermal event associated with the melting of the crystalline drug. Storage of the amorphous MP did not trigger crystallization processes but certain changes of the thermal properties were manifested. As a result of rapid solvent removal during the spray drying process, polymer chains are immobilized while trying to reach equilibrium<sup>18,37</sup>. The increase of  $T_g$  detected during storage may be attributed to local molecular rearrangement of polymeric chains in any free space available, as the polymer progresses toward thermal equilibrium.

Reverse heat flow curves of the MP with a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion (Figure 7B and 7C) revealed that M2 and ME2 MP remained unchanged with  $T_g$  values of  $67.7 \pm 2.2^\circ\text{C}$  and  $67.2 \pm 1.3^\circ\text{C}$ , respectively. Even though they are amorphous in nature, these systems retained their initial structure. Sometimes, the drug that was incorporated into the polymer matrix acts like an anti-plasticizer, slowing down the physical aging of the matrix and hindering the relaxation processes of amorphous material<sup>17</sup>. Thermograms obtained for the AI2 MP (Figure 7C) differed from the other MP as two distinct thermal events were observed. The phase separation seen at the beginning of the stability study was even more pronounced after storage, showing the first thermal event at  $\sim 66^\circ\text{C}$  and the second at  $\sim 74^\circ\text{C}$ .

### Drug release behavior

Almost the same dissolution behavior was obtained for the MP containing a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion after storage for 10 months. Mathematical modeling has proven that all dissolution profiles matched biexponential equations (Table 2). The burst releases for these MP ranged between  $50.3 \pm 5.2$  and  $57.6 \pm 7.0\%$  (A parameter, Table 2), while the burst rate constants varied between  $0.422 \pm 0.033$  and  $0.640 \pm 0.051 \text{ min}^{-1}$ . Statistical analyses confirmed that burst releases as well as rate constants have not changed significantly during storage ( $p > 0.05$ ). Regarding MP containing a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion, the burst releases of  $44.4 \pm 6.5$  and  $39.5 \pm 3.3\%$  and rate constants of  $0.423 \pm 0.036$  and  $0.552 \pm 0.033 \text{ min}^{-1}$  that were calculated for the M2 and ME2 MP, respectively, did not differ significantly from the initially obtained values. However, AI2 MP were characterized by an exceptionally high initial release ( $76.6 \pm 1.8\%$ , Table 2) with a burst release rate constant of  $0.505 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ . A significant change in the dissolution profile is apparent for AI2 MP, proving that the physical aging of samples seriously ruined initial MP characteristics.

Conclusively, samples have not undergone substantial crystallization during storage. This could be

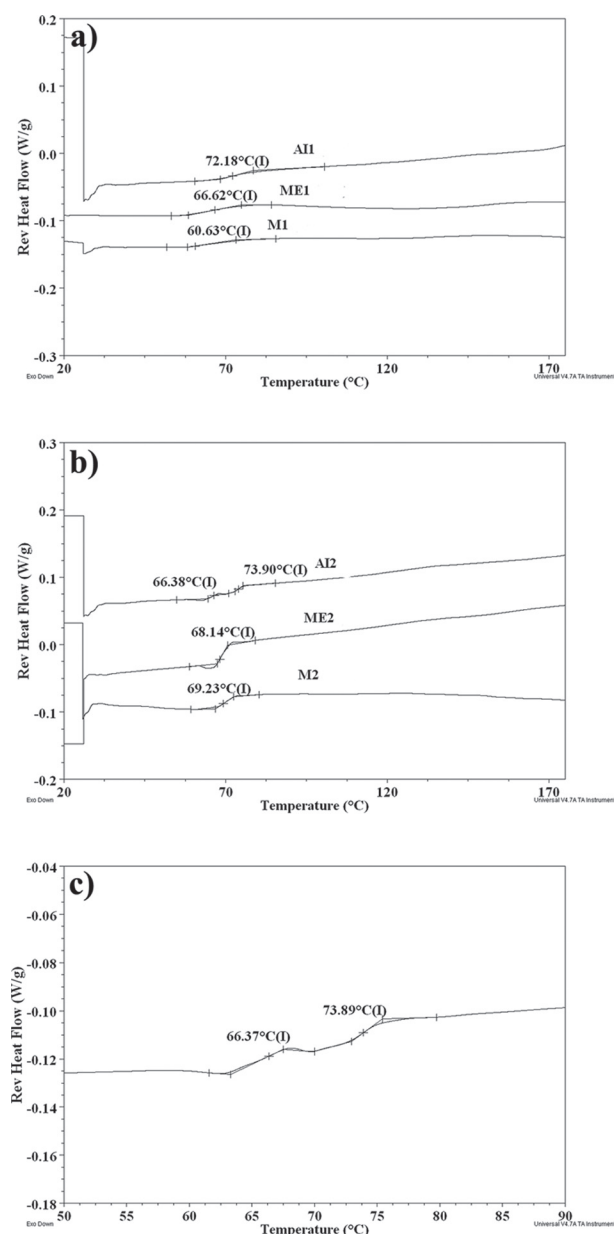


Figure 7. Reverse heat flow curves of the MP after storage for 10 months at  $25^\circ\text{C}/60\% \text{RH}$ : (A) M1, ME1 and AI1 with a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion; (B) M2, ME2 and AI2 with a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion; (C) zoomed reverse heat flow curve of the AI2 MP.

attributed to the low crystallization propensity of the mupirocin calcium as well as the ability of the polymer matrix to provide an energy barrier for such a process. The minor shifts of glass transition temperatures for a 1:5 (w/w) drug:polymer proportion substantiated the aging processes but have not influenced drug release patterns. Nonetheless, the MP with a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion, prepared from methanol and a methanol:ethanol mixture, remained physically stable and maintained the original release profile. At the same time, a prominent phase separation was confirmed for the AI2 MP, which contributed to the considerable burst release.

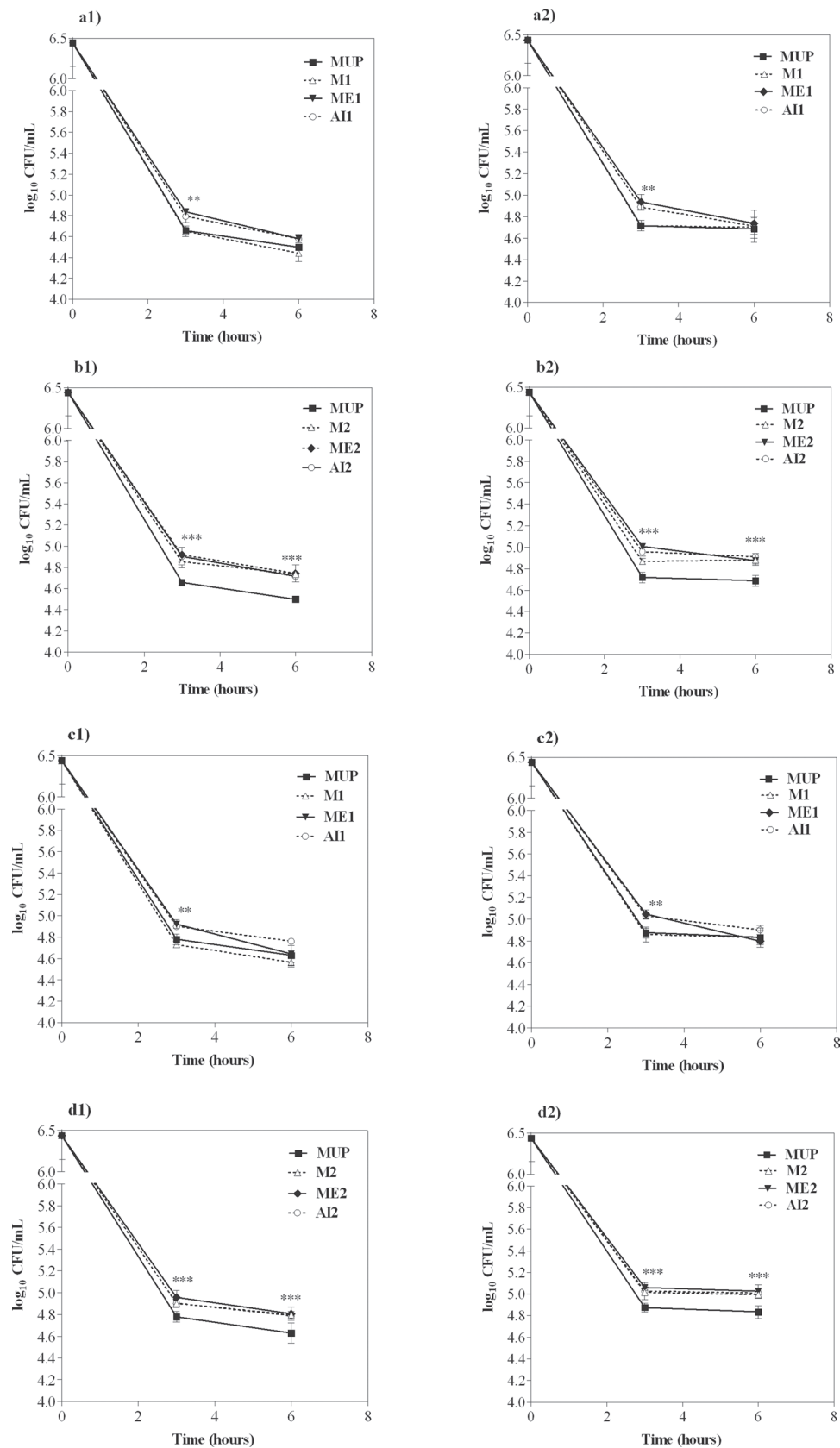


Figure 8. Time-kill curves for *S. aureus* ATCC 29213 (A1-D1) and *S. aureus* MRSA strains (A2-D2) exposed to free drug and MP at concentrations of 16  $\mu$ g/mL (A,B) and 8  $\mu$ g/mL (C,D) for 3 and 6 h. The asterisk represents a significant difference ( $p < 0.05$ ) between MP and the free drug.

## Antimicrobial activity of the MP

Time-kill assay curves for the MP are appraised, along with the drug, as presented in Figure 8. The MIC for *S. aureus* (ATCC 29213) was 0.125 µg/mL for all tested samples after 24 h of incubation, which was in agreement with our previous results. MIC values for *S. aureus* (MRSA) strains were between 0.25 and 0.5 µg/mL, which were found susceptible according to the published recommendation<sup>38</sup>. After 3 h of incubation, drug and M1 applied at concentrations of 16 and 8 µg/mL demonstrated a similar drop in colony counts of both tested *S. aureus* strains (4.6–4.7 and 4.7–4.9 log cfu/mL, respectively). Samples ME1 and AI1 were significantly different from the free drug, producing a drop to 4.8–4.9 and 4.8–5.0 log cfu/mL for ATCC 29213 and MRSA, respectively. However, upon 6 h of incubation, no significant difference was observed between the antimicrobial activity of MP and the free drug at both tested concentrations, which might be attributed to the complete drug release from the tested microsystems.

MP having a 2:1 (w/w) drug:polymer proportion (M2, ME2, AI2) were significantly less effective in comparison with the free drug ( $p < 0.05$ ), both after 3 and 6 h of incubation (Figure 8). These results of antimicrobial activity validate the drug release data, proving that the desired prolonged release was attained even with superior DL. All tested samples showed similar antimicrobial activity after 24 h (data not presented). Colony counts of *S. aureus* (ATCC 29213) that were exposed to 16 µg/mL for 24 h dropped to approximately 3.9 log cfu/mL, which corresponds to a 99.7% reduction of initial inoculum, while a concentration of 8 µg/mL decreased the bacterial concentration to approximately 4.2 log cfu/mL (99.3% reduction). MRSA counts dropped to 4.3 log cfu/mL (99.3% reduction) and 4.5 cfu/mL (99% reduction), respectively. These findings substantiate that the incorporation of drug into the polymer did not compromise its antibacterial activity. Despite the high bactericidal concentrations employed, the time-kill assay was sensitive enough to detect differences between the drug and MP, providing strong evidence of the ability of the MP to prolong drug release. It is also important to note that any prospective usage of such microsystems in skin therapy requires adjustment of the initial dose of a once-a-day formulation.

## Conclusions

Evaluation of spray dried Eudragit® RS-based mupirocin calcium-loaded MP provided evidence that the feed solvent influenced the physical characteristics, stability and performance of MP. Drug-polymer miscibility and the corresponding thermal properties, morphology, drug release and antimicrobial activity were dependent on the DL and the solvent used. The superior control of drug release from MP was achieved with a higher DL (2:1 (w/w) drug:polymer proportion) using solvents in the following order: methanol  $\approx$  methanol:ethanol (50:50) >

isopropanol:acetone (40:60). The influence of the solvent on the morphology was less pronounced for particular DL, but it altered drug-polymer miscibility, conceivably as a result of different solidification kinetics. Moreover, a time-kill assay performed on *S. aureus* (ATCC 29213) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) confirmed a prolonged release and preservation of antimicrobial activity of encapsulated drug. Irrespective of the solvents used, the lower DL (1:5 (w/w) drug:polymer proportion) yielded less control over the drug, as supported by the drug release and antimicrobial activity data. For this drug:proportion, the solvent affected the thermal properties, but without a noteworthy impact on performance. Generally, good stability upon storage was obtained, excluding MP with a phase separation that was present initially.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

## References

- Re MI. (2006). Formulating drug delivery systems by spray drying. *Drying Technology*, 24:433–446.
- Vehring R. (2008). Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res*, 25:999–1022.
- Soundrapandian C, Basu D, Sa B, Datta S. (2011). Local drug delivery system for the treatment of osteomyelitis: *In vitro* evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*, 37:538–546.
- Jain D, Carvalho E, Banthia AK, Banerjee R. (2011). Development of polyvinyl alcohol-gelatin membranes for antibiotic delivery in the eye. *Drug Dev Ind Pharm*, 37:167–177.
- Freiberg S, Zhu XX. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm*, 282:1–18.
- Hadinoto K, Cheow WS. (2009). Hollow spherical nanoparticulate aggregates as potential ultrasound contrast agent: Shell thickness characterization. *Drug Dev Ind Pharm*, 35:1167–1179.
- Nekkanti V, Muniyappan T, Karatgi P, Hari MS, Marella S, Pillai R. (2009). Spray-drying process optimization for manufacture of drug-cyclodextrin complex powder using design of experiments. *Drug Dev Ind Pharm*, 35:1219–1229.
- Miller-Chou BA, Koenig JL. (2003). A review of polymer dissolution. *Prog Polym Sci*, 28:1223–1270.
- Raula J, Eerikäinen H, Kauppinen EI. (2004). Influence of the solvent composition on the aerosol synthesis of pharmaceutical polymer nanoparticles. *Int J Pharm*, 284:13–21.
- Wulsten E, Kiekens F, van Dycke F, Voorspoels J, Lee G. (2009). Levitated single-droplet drying: Case study with itraconazole dried in binary organic solvent mixtures. *Int J Pharm*, 378:116–121.
- Esposito E, Roncarati R, Cortesi R, Cervellati F, Nastruzzi C. (2000). Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: Influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharm Dev Technol*, 5:267–278.
- Gander B, Wehrli E, Alder R, Merkle HP. (1995). Quality improvement of spray-dried, protein-loaded D,L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection. *J Microencapsul*, 12:83–97.
- Zhang ZY, Ping QN, Xiao B. (2000). Microencapsulation and characterization of tramadol-resin complexes. *J Control Release*, 66:107–113.
- Bain DE, Munday DL, Smith A. (1999). Solvent influence on spray-dried biodegradable microspheres. *J Microencapsul*, 16:453–474.

15. Luna-Barcenas G, Meredith JC, Sanchez IC, Johnston KP. (1997). Relationship between polymer chain conformation and phase boundaries in a supercritical fluid. *J Chem Phys*, 107:10782–10792.
16. Al-Obaidi H, Brocchini S, Buckton G. (2009). Anomalous properties of spray dried solid dispersions. *J Pharm Sci*, 98:4724–4737.
17. Rosilio V, Deyme M, Benoit JP, Madelmont G. (1998). Physical aging of progesterone-loaded poly(D,L,-lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharm Res*, 15:794–798.
18. Allison SD. (2008). Effect of structural relaxation on the preparation and drug release behavior of poly(lactic-co-glycolic)acid microparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci*, 97:2022–2035.
19. Sipos P, Szabó A, Erős I, Szabó-Révész P. (2008). A DSC and Raman spectroscopic study of microspheres prepared with polar cosolvents by different techniques. *J Therm Anal Calorim*, 94:109–118.
20. Dürriegl M, Kwokal A, Hafner A, Segvic Klaric M, Dumicic A, Cetina-Cižmek B et al. (2011). Spray dried microparticles for controlled delivery of mupirocin calcium: Process-tailored modulation of drug release. *J Microencapsul*, 28:108–121.
21. Parenti MA, Hatfield SM, Leyden JJ. (1987). Mupirocin: A topical antibiotic with a unique structure and mechanism of action. *Clin Pharm*, 6:761–770.
22. Embil K, Nacht S. (1996). The Microsponge Delivery System (MDS): A topical delivery system with reduced irritancy incorporating multiple triggering mechanisms for the release of actives. *J Microencapsul*, 13:575–588.
23. Beck RC, Pohlmann AR, Hoffmeister C, Gallas MR, Collnot E, Schaefer UF et al. (2007). Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between *in vitro* drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm*, 67:18–30.
24. Lionzo MI, Ré MI, Guterres SS, Pohlmann AR. (2007). Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(epsilon-caprolactone) blends to control the release of a drug model. *J Microencapsul*, 24:175–186.
25. Rassu G, Gavini E, Spada G, Giunchedi P, Marceddu S. (2008). Ketoprofen spray-dried microspheres based on Eudragit RS and RL: Study of the manufacturing parameters. *Drug Dev Ind Pharm*, 34:1178–1187.
26. Wang FJ, Wang CH. (2002). Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres. *J Microencapsul*, 19:495–510.
27. Palmieri GF, Bonacucina G, Di Martino P, Martelli S. (2001). Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: Advantages and limits. I. Water-soluble drugs. *Drug Dev Ind Pharm*, 27:195–204.
28. Rizi K, Green RJ, Donaldson M, Williams AC. (2011). Production of pH-responsive microparticles by spray drying: Investigation of experimental parameter effects on morphological and release properties. *J Pharm Sci*, 100:566–579.
29. da Silva AA Jr, de Matos JR, Formariz TP, Rossanezi G, Scarpa MV, do Egito ES et al. (2009). Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. *Int J Pharm*, 368:45–55.
30. DiNunzio JC, Hughey JR, Brough C, Miller DA, Williams RO 3<sup>rd</sup>, McGinity JW. (2010). Production of advanced solid dispersions for enhanced bioavailability of itraconazole using KinetiSol Dispersing. *Drug Dev Ind Pharm*, 36:1064–1078.
31. Hancock BC, Zografi G. (1997). Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci*, 86:1–12.
32. Weuts I, Kempen D, Decorte A, Verreck G, Peeters J, Brewster M et al. (2004). Phase behaviour analysis of solid dispersions of loperamide and two structurally related compounds with the polymers PVP-K30 and PVP-VA64. *Eur J Pharm Sci*, 22:375–385.
33. van Drooge DJ, Hinrichs WL, Visser MR, Frijlink HW. (2006). Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques. *Int J Pharm*, 310:220–229.
34. Tajber L, Corrigan OI, Healy AM. (2005). Physicochemical evaluation of PVP-thiazide diuretic interactions in co-spray-dried composites-analysis of glass transition composition relationships. *Eur J Pharm Sci*, 24:553–563.
35. Janssens S, De Zeure A, Paudel A, Van Humbeek J, Rombaut P, Van den Mooter G. (2010). Influence of preparation methods on solid state supersaturation of amorphous solid dispersions: A case study with itraconazole and Eudragit e100. *Pharm Res*, 27:775–785.
36. Yeo Y, Park K. (2004). Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res*, 27:1–12.
37. Bouissou C, Rouse JJ, Price R, van der Walle CF. (2006). The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: Remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res*, 23:1295–1305.
38. Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA; Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. (2004). Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: Results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. *Int J Antimicrob Agents*, 23:577–581.



# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## PRIPRAVA ČVRSTIH DISPERZIJA ZA KONTROLIRANO OSLOBAĐANJE LIJEKA METODOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Marjana Dürrigl

Pliva Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj generičkih proizvoda, Zagreb

### Sažetak

Za potrebe rada pripravljene su i karakterizirane poli(met)akrilne mikročestice s uklopljenim mupirocin kalcijem primjenom tehnike sušenja raspršivanjem. Istraženi su utjecaji omjera lijeka i polimera (5 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, *m/m*), ulazne temperature (70 – 110 °C), koncentracije otopine za raspršivanje (1%-5%, *m/m*), otapala za pripremu otopine za raspršivanje te fizičkih oblika polimera na učinkovitost uklapanja lijeka u mikročestice, iskorištenje procesa, brzinu oslobađanja lijeka iz mikročestica, morfologiju i veličinu čestica te svojstva čvrstog stanja i fizičku stabilnost. Veličina čestica analizirane je metodom difrakcije laserske zrake pri niskom kutu, a morfologija primjenom elektronskog mikroskopa. Svojstva čvrstog stanja određena su primjenom rendgenske difrakcije, modulirane diferencijalne pretražne kalorimetrije i termogravimetrije te Fourier transformirane infracrvene i Ramanove spektroskopije. Kinetika oslobađanja lijeka iz mikročestica analizirana je pomoću monoeksponencijalnih i bieksponecijalnih matematičkih modela. Ispitana je antimikrobna djelotvornost mikročestica na sojevima *Staphylococcus aureus* radi potvrde funkcionalnosti pripremljenih mikročestica kojima se postiže najpovoljnije *in vitro* oslobađanje lijeka.

Najuspješnije kontrolirano oslobađanje ostvareno je za uzorke s povećanim udjelom lijeka (omjer lijeka i polimera 2 : 1, *m/m*), pripremljenim pri povišenim ulaznim temperaturama (100 – 110 °C) ili iz otopina sa sniženom koncentracijom otopine za raspršivanje (<4%, *m/m*). Kontrolirano oslobađanje lijeka ostvareno je i za mikročestice izrađene iz različitih otapala sljedećim redoslijedom: metanol = metanol-etanol (50 : 50, *m/m*) > aceton-izopropanol (40 : 60, *m/m*). Mikročestice izrađene iz različitih otapala bile su fizički stabilne tijekom deset mjeseci, bez znatnijih promjena u načinu oslobađanja lijeka. Antimikrobna djelotvornost lijeka oslobođenoga iz mikročestica pokazao da je lijek sačuvao svoju aktivnost i nakon procesa mikrokapsuliranja. Također, usporeno oslobađanje lijeka potvrđeno je studijama dinamike uginuća na *S. aureus* (ATCC 29213) i na meticilin-rezistentnom soju *S. aureus* (MRSA).

Općenito, početna zasićenost lijeka/polimer u otopini, kao i ulazna temperatura i uporabljena otapala upravljaju procesom očvršćivanja tijekom sušenja kapljice te, posljedično, morfologijom mikročestica i načinom oslobađanja lijeka. Procesom sušenja raspršivanjem iz otopine lijeka i polimera nastaju amorfne čvrste disperzije. Ovisno o omjeru lijeka i polimera, one su čvrste otopine ili kombinacije čvrste otopine i amorfnih nakupina lijeka. Kontrolirano oslobađanje lijeka ostvareno je samo iz amorfnih čvrstih otopina, uz preduvjet da je polimerni matriks nastao kasnije u procesu sušenja, nakon dovoljnog sažimanja kapljice i stvaranja gušćega polimernog matriksa.

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici.

(195 stranice, 42 slike, 30 tablica, 256 literaturnih navoda, izvornik je na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: sušenje raspršivanjem, čvrste disperzije, kontrolirano oslobađanje lijeka, stabilnost, antimikrobna djelotvornost, svojstva čvrstog stanja

Voditelj: Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić, red. profesorica  
Ocjenjivači: Dr. sc. Mira Bećirević-Laćan, red. profesor  
Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić, red. profesorica  
Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, znan. Savjetnica

Datum prihvatanja rada: 15. lipnja 2011.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral Thesis

### PREPARATION OF SOLID DISPERSIONS FOR CONTROLLED DRUG RELEASE VIA SPRAY DRYING

**Marjana Dürriegl**

Pliva Croatia Ltd., Generics Research and Development, Zagreb

#### **Summary**

Mupirocin calcium-loaded poly(meth)acrylic-based microparticles were prepared using spray drying technique. The influence of drug:polymer ratio (5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, w/w), inlet temperature (70 - 110°C), feed concentration (1%-5%, w/w), feed solvent and physical forms of the polymer on drug encapsulation, yield, *in vitro* drug release, morphology, particle size and solid state properties of the microparticles were investigated. Morphology and particle size were determined using low-angle laser light scattering and scanning electron microscopy. Profound solid state characterization of the microparticles was conducted using X-ray powder analysis (XRPD), thermogravimetric analyses (TGA), modulated differential scanning calorimetry (MDSC), Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and Fourier transformed Raman spectroscopy (FT Raman). Mathematical modelling (monoexponential and biexponential equations) was applied to characterize drug release kinetics. In addition, a time-kill assay was performed using *S. aureus* (ATCC 29213) and clinically isolated methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains at two concentrations in order to evaluate the antimicrobial activity of microsystems.

The best control over mupirocin release was achieved for 2:1, w/w drug:polymer ratio and found to be strongly process-dependant. The increased feed concentration (>4%) resulted in higher burst release due to looser matrix formation, whereas increased inlet temperature ( $\geq 100^\circ\text{C}$ ) reduced burst release since formation of polymer matrices was enhanced by higher molecular mobility and lower solvent residues. The superior control of drug release from microparticles was achieved with a 2:1, w/w drug:polymer ratio using solvents in the following order: methanol  $\approx$  methanol:ethanol (50:50, w/w) > isopropanol:acetone (40:60, w/w).

The physical aging of the solid dispersion after ten months of storage had negligible impact on the microparticle performance. Moreover, a time-kill assay performed on *S. aureus* (ATCC 29213) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) confirmed a prolonged release and preservation of antimicrobial activity of encapsulated drug. In general, variations of initial saturation of drug/polymer, inlet temperature or solvent used, were recognised as efficient tools to modulate the formation of proper polymer matrices. Drug loading solely is not a sufficient and reliable predictor of drug release pattern and should be evaluated in conjunction with corresponding processing parameters. Complete encapsulation of drug was achieved in all microparticles prepared from feed solution. Solid dispersions are frequently generated in the spray drying process. The obtained solid dispersions are either solid solutions or inhomogeneous solid dispersions containing amorphous drug clusters depending on the drug:polymer ratio. Controlled drug release was achieved from amorphous solid solutions only if well-formed (denser) polymer matrix was generated later in drying process (which could be tailored via appropriate spray drying processing).

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry and University Library (195 pages, 42 figures, 30 tables, 256 references, original in Croatian language)

Keywords: spray drying, solid dispersions, controlled drug release, stability, antimicrobial activity, solid state properties

Supervisor: Jelena Filipović-Grčić, Ph. D., Professor  
Reviewers: Mira Bečirević-Laćan, Ph. D., Professor  
Jelena Filipović-Grčić, Ph. D., Professor  
Biserka Cetina-Čižmek, Ph. D., Senior Scientist

Thesis accepted: 15 June, 2011.